

Acción del *locus* TH-insulina en la cardiogénesis

Tesis Doctoral

Doctorando: Enrique Martínez Campos

Directora de Tesis: Catalina Hernández Sánchez

Tutor: Alberto Martínez Serrano

Universidad Autónoma de Madrid - 2012

ABSTRACT

Tyrosine hydroxylase (TH) and insulin are well-characterized independent genes that are situated in tandem, a syntenic organization that can be traced to the early metazoans. Whereas the roles of these proteins postnatally are well known, the presence and function of the TH-insulin *locus* in organogenesis is unclear. The aim of this study was to define the expression of *Th* and insulin genes during cardiac development and to unravel their role in heart formation.

Th expression and activity was analyzed in early chick cardiogenesis. Addition of dopamine induced ectopic expression of *Bmp-2*, linking TH to early cardiac differentiation programmes. Overexpression of *Th* led to increased atrial myosin heavy chain (AMHC-1) and T-box 5 gene (TBX5) expression in the anterior region of the cardiac tube and induced bradyarrhythmia. Exposure to retinoic acid induced the expression of *Th* in parallel to that of *Amhc-1* and *Tbx5*. Concordantly, inhibition of endogenous retinoic acid synthesis decreased the expression of *Th* as well as that of *Amhc-1* and *Tbx5*.

Insulin levels were also strictly regulated during cardiac development. The expression of two embryonic mRNA isoforms of insulin, *Pro1B* and *Pro1B1*, that differ from the pancreatic transcript was characterized on the embryonic cardiac tube, being the *Pro1B1* the predominant isoform after the linear tube formation. Overexpression of the translationally active proinsulin embryonic transcript, *Pro1B*, and even more of the pancreatic transcript, *Pro1A*, caused cardiac malformations. Overexpression of *Pro1B* led to the reduction of *Amhc-1* and *Tbx5* expression. Moreover, expansion of *Vmhc-1* expression into the posterior region of the cardiac tube was detected.

Thus, TH and insulin are expressed in a dynamic pattern during the primitive heart tube formation. This locus is involved in the network of signals that drive early cardiac chamber specification, acting as a key regulators of the embryonic chick heart morphogenesis.

1. ÍNDICE.

	Pág.
1. ÍNDICE	5
2. ABREVIATURAS	9
3. INTRODUCCIÓN	15
3.1. Expresión de la <i>Th</i> en el organismo adulto y en el desarrollo embrionario.	19
3.2. Expresión de la proinsulina en el organismo adulto y en el desarrollo embrionario.	21
3.3. Acción de la proinsulina en el desarrollo embrionario.	23
3.4. Desarrollo del corazón embrionario.	24
3.4.1. Una visión general de la morfogénesis cardíaca.	24
3.4.2. La especificación de los progenitores cardíacos y su destino en la organogénesis.	26
3.4.3. Establecimiento de la identidad anterior y posterior en el tubo cardíaco primitivo.	26
3.4.4. Endocardio, proepicardio y epicardio.	27
3.5. Redes de regulación génica en el desarrollo cardíaco.	30
3.6. La expresión y la función de la TH en el desarrollo cardíaco.	32
3.7. La expresión y la función de la insulina en el desarrollo cardíaco.	33
4. OBJETIVOS	37
5. MATERIALES Y MÉTODOS	41
5.1. Animales de experimentación y obtención de tejidos.	43
5.2. Cultivo de embriones de pollo (método EC).	44
5.3. Detección e identificación de RNA mensajero.	44
5.3.1. RT-PCR semicuantitativa.	44
5.3.2. RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR).	46
5.3.3. Obtención de sondas para hibridación <i>in situ</i> (HIS).	46
5.3.4. Hibridación <i>in situ</i> en embriones completos.	47
5.4. Tratamiento con citral.	48
5.5. Implantación de microesferas.	48
5.6. Criocortes de embriones completos.	49
5.7. Análisis por HPLC.	49
5.8. Electroporación de células precardiáticas de la línea primitiva.	50

5.9. Generación de las construcciones con el plásmido pCAGs-I-GFP.	51
5.10. Extracción proteica e inmunodetección en membrana (<i>Western Blot</i>).	51
6. RESULTADOS	53
6.1. Expresión génica de la <i>Th</i> durante el desarrollo cardíaco temprano del embrión de pollo. Actividad de la ruta de síntesis de catecolaminas.	55
6.1.1. Expresión de la <i>Th</i> en el proepicardio.	57
6.2. Inducción de genes cardíacos por implantación de microesferas de dopamina.	58
6.3. Análisis del efecto de la sobreexpresión de la <i>Th</i> en la región precardiogénica del embrión de pollo.	60
6.4. Implicación de la TH en la ruta del ácido retinoico.	62
6.4.1. Implantación de microesferas impregnadas en ácido retinoico.	62
6.4.2. Inhibición de la ruta de síntesis de ácido retinoico a través de la administración de citral.	63
6.5. Expresión de los receptores dopaminérgicos en la región cardíaca del embrión de pollo.	64
6.6. Análisis de la expresión de la proinsulina en el embrión de pollo durante el desarrollo cardíaco.	65
6.7. Análisis del efecto de la sobreexpresión de proinsulina en la región precardiogénica del embrión de pollo.	67
6.8. Estudio de la expresión de la proinsulina en el desarrollo cardíaco del embrión de ratón.	74
7. DISCUSIÓN	75
7.1. Expresión de la <i>Th</i> y actividad de la ruta de síntesis de catecolaminas en el desarrollo cardíaco.	77
7.2. Implicación de la TH en programas tempranos de diferenciación cardíaca.	77
7.3. Implicación de la TH en el establecimiento de patrones en el tubo cardíaco.	79
7.4. Expresión de la <i>Th</i> en el proepicardio.	81
7.5. Efecto de la sobreexpresión génica de la proinsulina en el desarrollo cardíaco.	82
8. CONCLUSIONES	85
9. BIBLIOGRAFÍA	89
10. ÍNDICE DE FIGURAS	107
11. ANEXOS	111

2. ABREVIATURAS.

2. ABREVIATURAS

AR: ácido retinoico.

AMHC-1: del inglés *auricular myosin heavy chain 1*.

AMPC: adenosinmonofosfato cíclico.

ATF2 : del inglés *activating transcription factor 2*.

BBR: del inglés *Boehringer blocking powder*.

BCIP: del inglés *5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt*.

BMP: del inglés *bone morphogenetic protein*.

BSA: del inglés *bovine serum albumin*.

cDNA: del inglés *complementary deoxiribonucleic acid*.

cTH: del inglés *chicken tyrosine hydroxylase*.

DBH: dopamina β -hidroxilasa.

DHBA: dihidroxi-benzilamina.

DNA: del inglés *deoxiribonucleic acid*.

DMSO: dimetilsulfóxido.

DEPC: dietilpirocarbonato.

E: día embrionario.

EC: del inglés *early chick*.

EDTA: etilendiaminotetraacético.

FGF: del inglés *fibroblast growth factor*.

GAPDH: del inglés *glyceraldehyde phosphate dehydrogenase*.

GATA: del inglés *globin transcription factor*.

GFP: del inglés *green fluorescent protein*.

HAND: del inglés *heart and adrenal crest derivatives expressed*.

HEX: del inglés *haematopoietically expressed homeobox*.

HIS: hibridación *in situ*.

HPLC: del inglés *high performance liquid chromatography*.

IGF: del inglés *insulin-like growth factor*.

IGF-IR: del inglés *Insulin-like growth factor insulin receptor*.

INS: insulina.

Int1: intrón 1.

IR: del inglés *insulin receptor*.

IRS-1: del inglés *insulin receptor substrate 1*.

IRX: del inglés *iriquois*.

ISL: del inglés *islet*.

L-DOPA: L-3,4-dihidroxifenilalanina.

lncRNA: del inglés *long non-coding RNA*.

lpm: latidos por minuto.

MEF: del inglés *myocyte-specific enhancer factor*.

MLC: del inglés *myosine light chain*.

MHC: del inglés *myosine heavy chain*.

miRNA: del inglés *micro RNA*.

mM: milimolar.

mRNA: del inglés *messenger ribonucleic acid*.

mV: milivoltio.

NBT: del inglés *nitro blue tetrazolium*.

NAD: nicotinamida adenina dinucleótido.

NKX2.5: del inglés *Nk2 homeobox 5*.

PITX: del inglés *paired-like homeodomain*.

PTEN: del inglés *phosphatase and tensin homolog*.

PBS: del inglés *phosphate buffer saline*.

PBT: PBS-Tween.

PCR: del inglés *polymerase chain reaction*.

PE: proepicardio.

PFA: paraformaldehído.

PKB: del inglés *protein kinase B*. También conocida como Akt.

PVDF: del inglés *polyvinylidene fluoride*.

p/v: peso/volumen.

qPCR: del inglés *quantitative polymerase chain reaction*.

RPC: región precardiogénica.

RNA: del inglés *ribonucleic acid*.

RT: del inglés *reverse transcription*.

SOX17: del inglés *SRY-related HMGbox 17*.

SHH: del inglés *sonic hedgehog*.

SMAD: del inglés *small mothers against decapentaplegic*.

snRNA: del inglés *small nuclear RNA*.

SRF: del inglés *serum response factor*.

st: del inglés *stage*.

TAB: del inglés *TAK binding protein*.

TAK: del inglés *TGF β -activated kinase*.

TBX: del inglés *T-box*.

TC: tubo cardíaco.

TE: tubos endocárdicos.

TGF- β : del inglés *transforming growth factor β* .

TH: tirosina hidroxilasa.

TH-INS: transcrito quimera de tirosina hidroxilasa e insulina.

TN: troponina.

tRNA: del inglés *transfer ribonucleic acid*.

UPL: del inglés *universal probe library*.

UTR: del inglés *untranslated region*.

VEGF: del inglés *vascular endothelial growth factor*.

VMHC-1: del inglés *ventricular myosin heavy chain 1*.

μ l: microlitro.

μ g: microgramo.

μ M: micromolar.

μ m: micrometro.

WNT: del inglés *wingless type MMTV integration site member*.

WT: del inglés *Wilms'tumour*.

3. INTRODUCCIÓN.

3. INTRODUCCIÓN

A lo largo de las últimas décadas, se ha constatado que la complejidad biológica no está únicamente correlacionada con el número de genes presentes en los organismos. Así, se ha visto que no existe una equivalencia directa entre la cantidad de genes de un organismo y el tamaño de su proteoma. El análisis del genoma humano concluye que los aproximadamente 21000 genes identificados pueden dar lugar a más de un millón de proteínas diferentes a lo largo de todo nuestro ciclo vital (Humphery-Smith *et al*, 2004; Clamp *et al*, 2007). Procesos como múltiples sitios de inicio de transcripción (Carninci, 2006), procesamiento alternativo de intrones y del extremo 3' (Brett *et al*, 2002; Kuersten y Goodwin, 2003, Ast, 2004;), edición del premRNA (Wahl *et al*, 2009) y modificaciones post-traduccionales de proteínas (Bártová *et al*, 2008; Seo y Lee, 2004) son todos ellos fuentes importantes de diversidad proteica.

Además, los estudios de evolución y desarrollo han proporcionado numerosas evidencias de que la enorme variación fenotípica presente entre especies tampoco es debida a una variación notable en su número de genes. La novedad evolutiva puede aparecer a través de cambios en la regulación génica, que en ocasiones han demostrado ser un mecanismo evolutivo más significativo que los cambios en el tamaño del genoma (Gould, 2004; Carroll, 2008). El estudio de elementos de regulación post-transcripcional, como los miRNA (del inglés *micro RNA*) (Zhang y Su, 2009), los snRNA (del inglés *small nuclear RNA*) (Karijovich y Yu, 2010) o los lncRNA (del inglés *long non-coding RNA*) (Guttman *et al*, 2009), así como elementos conservados no codificantes (Lander, 2011) y transposones (Jurka *et al*, 2007) puede ayudar a comprender la relevancia de estos procesos en la innovación evolutiva.

Entre los nuevos mecanismos de regulación post-transcripcional caracterizados recientemente está la generación de transcritos quimera a partir de dos genes adyacentes aparentemente independientes que comparten la misma orientación (Parra *et al*, 2006; Prakash *et al*, 2010). En nuestro grupo hemos descrito la formación de transcritos quimera entre el mRNA de la tirosina hidroxilasa (TH) y el de la insulina durante el desarrollo embrionario de aves (Hernández-Sánchez *et al*, 2006).

Los genes de la *Th* y de la insulina se localizan en tándem en el mismo cromosoma (Fig. 1A), una organización sinténica muy conservada a lo largo de los *phyla*. Por ejemplo, en el anfibio se ha descrito una región de parálogos conteniendo un gen de hidroxilasa de aminoácidos aromáticos seguido por un gen relacionado con el de la insulina (Patton *et al*, 1998; Hernández-Sánchez *et al*, 2006). Los transcritos quimera en pollo se generan por la fusión del mRNA de la *Th* y el de la insulina (Fig.1B). Así, la quimera *Th-Ins1* está formada por gran parte de la secuencia de la *Th* (los primeros 12 exones y parte del exón 13) unidos a los exones 2 y 3 de la proinsulina. Este transcrito codifica una versión inestable de la TH que, además, presenta una actividad enzimática disminuida respecto a la TH canónica. También contiene la región codificante de la proinsulina y puede dar lugar a proinsulina, aunque en mucha menor proporción que cualquiera de los transcritos embrionarios de proinsulina que se describirán posteriormente. La quimera *Th-Ins2* contiene la misma secuencia de la *Th* que la *Th-Ins1* pero únicamente el exón 3 de la proinsulina, y genera una isoforma truncada de la TH con menor

3.1. Expresión de la *Th* en el organismo adulto y en el desarrollo embrionario.

La TH es la primera enzima en la ruta de síntesis de catecolaminas, catalizando la conversión del aminoácido L-tirosina a L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), precursor éste de la dopamina. Por acción de la dopamina β-hidroxilasa (DBH), la dopamina es convertida a noradrenalina y finalmente a adrenalina por otras enzimas de la ruta (Fig. 2).

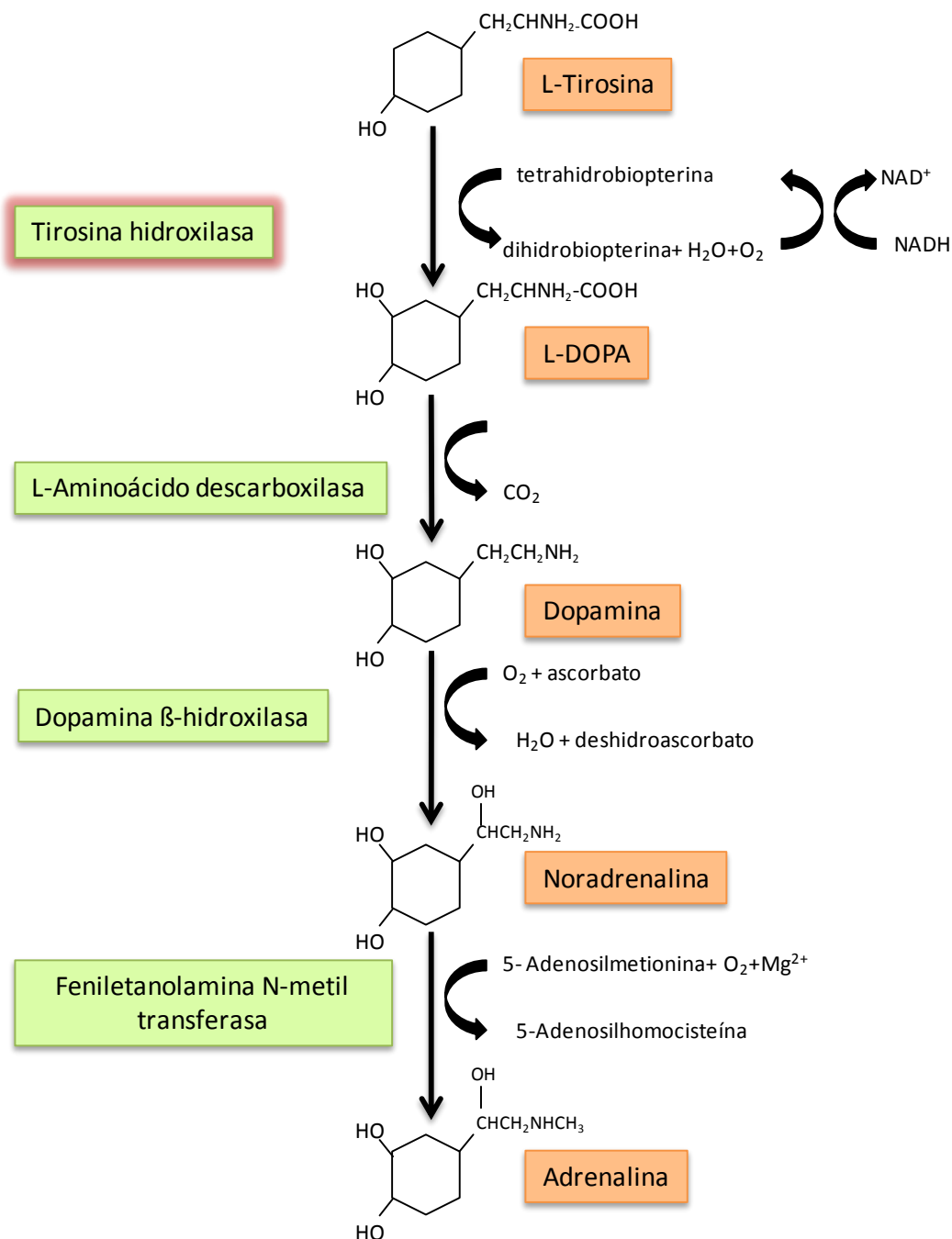


Figura 2. Ruta de síntesis de las catecolaminas. En naranja, se destacan los intermediarios y los productos. En verde, las enzimas que catalizan las reacciones de la ruta.

En el organismo adulto las catecolaminas se producen en las glándulas suprarrenales, ejerciendo una función hormonal, o en las neuronas del sistema nervioso simpático y del sistema nervioso central, actuando como neurotransmisores. De este modo, las catecolaminas ejercen un papel regulador sobre la fisiología endocrina y cardiovascular y en procesos como el movimiento, el aprendizaje y el comportamiento emocional (Fitzpatrick, 1999).

Las catecolaminas actúan principalmente a través de receptores de membrana acoplados a proteínas G, interruptores biológicos que realizan la transducción de señales al interior celular desencadenando una cascada de actividades enzimáticas o activando a segundos mensajeros como respuesta (Alberts, 2001). Los receptores dopaminérgicos son específicos para dopamina (Fig. 3), y los adrenérgicos unen noradrenalina y, con mayor afinidad, adrenalina. Se han descrito 5 receptores para dopamina (D1-D5) que se clasifican en dos familias, D1 (D1 y D5) y D2 (D2, D3 y D4), dependiendo del tipo de proteína G a la que estén asociados. La unión del ligando al receptor produce un cambio conformacional que permite la disociación de las subunidades α y β/γ de la proteína G heterotrimérica, activando así la señalización vía subunidad α y complejo β/γ . Los receptores de la familia D1 están acoplados a proteínas Gs, y transducen la señal estimulando la producción de AMPc. Los receptores de la familia D2 están acoplados a proteínas G α_i y G α_o , que inhiben la formación de AMPc, activan canales de K $^+$ y reducen la entrada de Ca $^{2+}$ a través de canales dependientes de voltaje (Alberts, 2001; Girault y Greengard, 2004).

Recientemente, se ha sugerido la existencia de receptores híbridos a partir de la formación de dímeros de diferentes tipos de receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores pueden formar homo- y heterodímeros, como puede ser el caso de los receptores de dopamina y de somatostatina en adenomas pituitarios (Ferone *et al*, 2009). De este modo, la señalización a través de la vía de la dopamina puede ser más compleja y depender del tejido analizado.

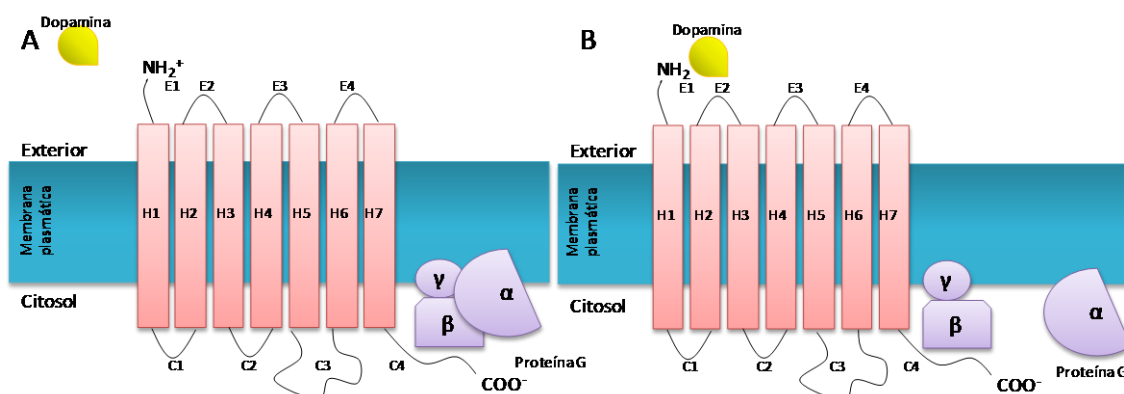


Figura 3. Esquema de un receptor dopaminérgico. Presenta 7 subunidades α -hélice transmembrana, con el extremo amino-terminal hacia el medio extracelular. A. Estado basal del receptor. En el interior celular se encuentra acoplado a una proteína G heterotrimérica, con sus subunidades α , β y γ . Tras la unión de la dopamina al receptor (B), la subunidad α de la proteína G se disocia y activa la respuesta celular.

La L-DOPA, además de ser un intermediario metabólico de la ruta de síntesis de catecolaminas y de melanina (Schallreuter *et al*, 2008), presenta efectos fisiológicos sobre la proliferación y diferenciación en la retina embrionaria (Lavado *et al*, 2006). Además, se ha descrito que la L-DOPA se une al receptor de membrana OA1, también acoplado a proteínas G (López *et al*, 2008), que se expresa en células pigmentadas de la retina.

Se conoce relativamente poco de la producción de las catecolaminas en el desarrollo embrionario previo a la diferenciación neuronal y adrenal. Se ha mostrado la producción de los primeros metabolitos de la ruta en embrión de pollo en neurulación: la L-DOPA se detectó desde día embrionario 1 (E1; st 6, según Hamburger y Hamilton, 1951), la dopamina desde E2 (st 12), y la noradrenalina y la adrenalina desde E3 (st 20) (Ignarro y Shideman, 1968). Así mismo, se detectó la presencia de las enzimas responsables de la catálisis de esta ruta en los mismos estadios. Coincidiendo con estos resultados, y ampliándolos, nuestro grupo ha mostrado la expresión del gen de la *Th* desde estadios de gastrulación en el embrión de pollo y ratón (Hernández-Sánchez *et al*, 2006; López-Sánchez *et al*, 2010).

Los datos sobre la posible función de las catecolaminas en el desarrollo embrionario son también escasos, aunque hay estudios que relacionan la presencia de las catecolaminas con un papel regulador en gastrulación y organogénesis temprana (Pendleton *et al*, 1998). El ratón *knockout* global para *Th* (mutante nulo) es letal embrionario y muere por fallo cardíaco (Zhou *et al*, 1995). El estudio de estos mutantes revela un papel funcional de la TH en el mantenimiento de la homeostasis del oxígeno en estadios intermedios de gestación (Ream *et al*, 2008). Estudios iniciados anteriormente en nuestro grupo y continuados en el desarrollo de esta Tesis muestran que la TH tiene un papel importante en cardiogénesis como se describirá más adelante (apartado 3.6 y Resultados).

3.2. Expresión de la proinsulina en el organismo adulto y en el desarrollo embrionario.

La insulina es una hormona anabólica responsable de mantener la homeostasis de la glucosa en organismos postnatales. Su biosíntesis por las células β del páncreas ha constituido un modelo para el estudio de la expresión específica de tejido. En estas células se transcriben y traducen altos niveles de proinsulina, la cual es procesada a insulina por las proproteínas convertasas 2 y 3, y es secretada de forma regulada (Steiner *et al*, 1990; Rhodes, 2000).

Durante el desarrollo embrionario, la proinsulina tiene una función y expresión muy distintas a las descritas en el adulto. Así, en etapas previas a la formación del páncreas, la proinsulina se expresa en células distribuidas en las tres capas embrionarias, ectodermo, mesodermo y endodermo (Hernández-Sánchez *et al*, 2002), permanece sin procesar y posiblemente es secretada por medio de una vía constitutiva (Hernández-Sánchez *et al*, 1995 y 2002; Alarcón *et al* 1998). Además, en estadios previos al desarrollo del páncreas, el gen de la proinsulina presenta una regulación transcripcional y post-transcripcional diferente a la descrita para la insulina pancreática. En los últimos años nuestro grupo ha descrito en el embrión de pollo, en estadios prepancreáticos, la presencia de transcritos alternativos al mRNA pancreático. Así, el transcrito embrionario *Pro1B* comparte su región codificante con el transcrito pancreático, *Pro1A*, pero presenta una extensión de 32 nucleótidos en la región 5' no traducida (5'UTR; del inglés 5' *untranslated region*) (Fig. 4). La actividad traduccional del

transcrito embrionario *Pro1B* está parcialmente reprimida por la presencia de dos codones AUG en la 5'UTR (Hernández-Sánchez *et al*, 2003). El segundo transcrito embrionario, *Pro1B1*, es una variante del transcrito *Pro1B* la cual retiene el primer intrón situado en la 5'UTR (Fig. 4). La presencia de este intrón en la 5'UTR casi bloquea la traducción de la proinsulina, aunque no afecta al transporte del mRNA o a su estabilidad citoplásmica (Mansilla *et al*, 2005).

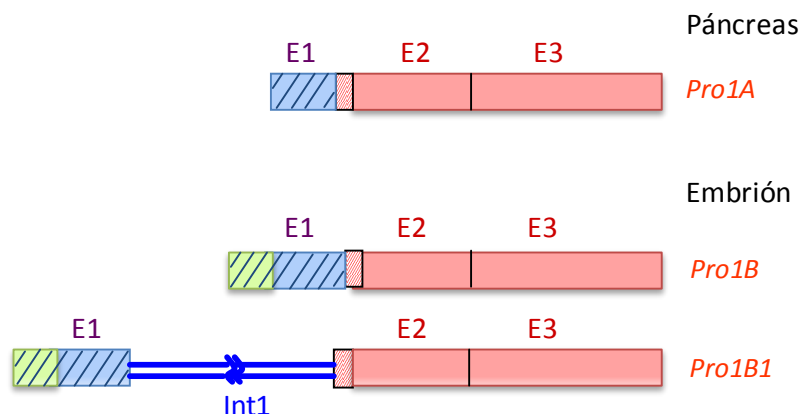


Figura 4. Esquema de los transcritos alternativos de proinsulina. Se muestra el transcrito pancreático (*Pro1A*) y los transcritos presentes en el desarrollo embrionario previos a la formación del páncreas (*Pro1B* y *Pro1B1*). Cada rectángulo representa un exón (E) y los exones están numerados. Las cajas sólidas representan la región codificante. Las cajas rayadas representan a la región no traducida. La extensión de 32 nucleótidos de los transcritos embrionarios se destaca en verde. Int1: intrón 1.

La forma procesada (*Pro1B*) y la forma que retiene el intrón 1 (*Pro1B1*) están reguladas de forma inversa durante el desarrollo del embrión de pollo. En estadios de gastrulación (st 4) la isoforma predominante es *Pro1B*, siendo casi indetectable la isoforma que contiene el intrón 1. Conforme avanza el desarrollo, la expresión de *Pro1B* disminuye, mientras que la isoforma que retiene el intrón aumenta (Mansilla *et al*, 2005). Las dos isoformas de mRNA embrionarias (*Pro1B* y *Pro1B1*) generan niveles de proinsulina muy inferiores a los producidos por el transcrito pancreático (*Pro1A*) (Hernández-Sánchez *et al*, 2003; Mansilla *et al*, 2005).

En rata y ratón, a diferencia de aves y humanos, existen dos genes similares que codifican para insulina: insulina 1 (*Ins1*) e insulina 2 (*Ins2*). El gen *Ins1* parece haberse originado a través de duplicación génica mediada por un retrotransposón a partir del gen ancestral, *Ins2* (Soares *et al*, 1985; Shiao *et al*, 2008). Además de presentar ciertas diferencias en su estructura, existe una regulación embrionaria característica para cada gen dependiente del tejido y del estadio analizado (Deltour *et al*, 1993).

La expresión de la proinsulina durante la cardiogénesis se describirá posteriormente en el apartado 3.7.

3.3. Acción de la proinsulina en el desarrollo embrionario.

En invertebrados la insulina no tiene un papel exclusivamente metabólico. Así, en nemátodos, la señalización a través del receptor de insulina controla el ciclo vital (Kimura *et al*, 1997) y en *Drosophila* controla el crecimiento y tamaño celular (Tatar *et al*, 2001). Durante el desarrollo embrionario de vertebrados, la insulina y su precursor, la proinsulina, son reguladores clave de la supervivencia celular (de Pablo *et al*, 1985; Travers *et al*, 1989). El bloqueo de la señalización de la insulina influye de manera deletérea en el crecimiento del embrión de pollo y provoca un incremento en la muerte celular (Morales *et al*, 1997; Díaz *et al*, 2000; Hernández-Sánchez *et al* 2002). Así mismo, la insulina y la proinsulina exógenas atenúan la muerte celular apoptótica inducida por privación de factores de crecimiento en embriones en neurulación en cultivo (Hernández-Sánchez *et al*. 2002). Por el contrario, un exceso de insulina o proinsulina también es dañino para el embrión e interfiere en su correcta morfogénesis, probablemente debido a una reducción excesiva en la muerte celular (de Pablo *et al*, 1985; Hernández-Sánchez *et al* 2002).

Las funciones fisiológicas de la insulina y de los factores de crecimiento similares a insulina (IGF; del inglés *insulin-like growth factor*) requieren de receptores de superficie celular específicos. El receptor de insulina (IR; del inglés *insulin receptor*) (Ebina *et al*, 1985) y el receptor de IGF de tipo 1 (IGF-1R) (Ullrich *et al*, 1986) pertenecen a la superfamilia de receptores tirosina kinasa (Ullrich *et al*, 1985). Ambos receptores presentan alta homología de secuencia de aminoácidos (70%) y de estructura. Están formados por dímeros en los que cada monómero está constituido por la unión covalente de una subunidad α y una β . Monómeros idénticos se ensamblan en la membrana plasmática mediante puentes disulfuro formando homodímeros. En tejidos donde hay expresión de ambos receptores se pueden formar heterodímeros constituidos por una hemimolécula del IR y otra del IGF-1R (Fig. 5). La unión del ligando produce un cambio conformacional que dispara la actividad tirosina kinasa del receptor e inicia una cascada de señalización intracelular que motiva diferentes respuestas biológicas (Nakae *et al*, 2001).

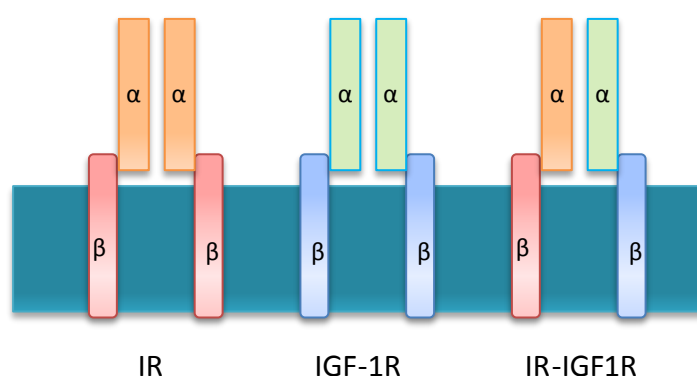


Figura 5. Esquema que muestra el receptor de insulina (IR), el receptor de IGF-I (IGF-IR) y el receptor híbrido (IR-IGF1R), destacando las subunidades α y β .

En estadios tempranos de desarrollo no se conoce con seguridad a través de que receptor ejerce su función la proinsulina, aunque evidencias encontradas en la retina de pollo sugieren

que la proinsulina podría estar señalizando a través de un receptor híbrido (García de Lacoba *et al*, 1999).

En mamíferos, el exón 11 del IR está sometido a procesamiento alternativo, dando lugar a dos isoformas del receptor (IRA e IRB), que difieren en la ausencia o presencia de 12 aminoácidos en el extremo C-terminal de la subunidad α (Ebina *et al*, 1985; Ullrich *et al*, 1985; Seino y Bell, 1989; Seino *et al* 1989). Ambas isoformas muestran diferencias en la afinidad de unión al ligando, actividad kinasa, internalización del receptor y reciclaje, así como en capacidad señalizadora y distribución tisular (Mosthaf *et al*, 1990; McClain, 1991; Vogt *et al*, 1991; Yamaguchi *et al*, 1991; Kellerer *et al*, 1992; Leibiger *et al*, 2001).

3.4. Desarrollo del corazón embrionario.

3.4.1. Una visión general de la morfogénesis cardíaca.

El corazón es el primer órgano funcional en el desarrollo de vertebrados. Desde etapas tempranas tiene un papel vital en la distribución de nutrientes y oxígeno en el embrión, así como en la recogida de productos de desecho procedentes de la actividad metabólica (Buckingham *et al*, 2005). La rápida tasa de crecimiento del embrión limita muy pronto la toma de oxígeno y nutrientes por difusión, por lo que el sistema cardiovascular debe satisfacer la demanda metabólica embrionaria (Olson, 2004).

En aves y mamíferos, los progenitores cardíacos comienzan a generarse durante las etapas iniciales de gastrulación, a partir de células del epiblasto que ingresan a través de la línea primitiva y se sitúan bilateralmente en el mesodermo lateral (García-Martínez y Schoenwolf, 1993; Schoenwolf y García Martínez; 1995; Tam *et al*, 1997). Tras la separación del mesodermo lateral en dos láminas (mesodermo somático y esplácnico) y la formación de la cavidad celómica, los precursores cardíacos se sitúan en el mesodermo esplácnico, y constituyen el mesodermo cardiogénico de los campos cardíacos bilaterales (revisado en Brand, 2006; Abu-Issa y Kirby, 2007 y 2008). Más tarde, los progenitores cardíacos migran a la región anterior y medial del embrión dando lugar al crecienta cardíaco en el embrión de ratón y a los tubos endocárdicos en el embrión de pollo, que posteriormente se fusionarán en la línea media, dando lugar al tubo cardíaco lineal (Colas *et al*, 2001; Redkar *et al*, 2001; Moreno-Rodríguez *et al*, 2006; Abu-Issa y Kirby, 2007 y 2008) (Fig. 6 y 9A).

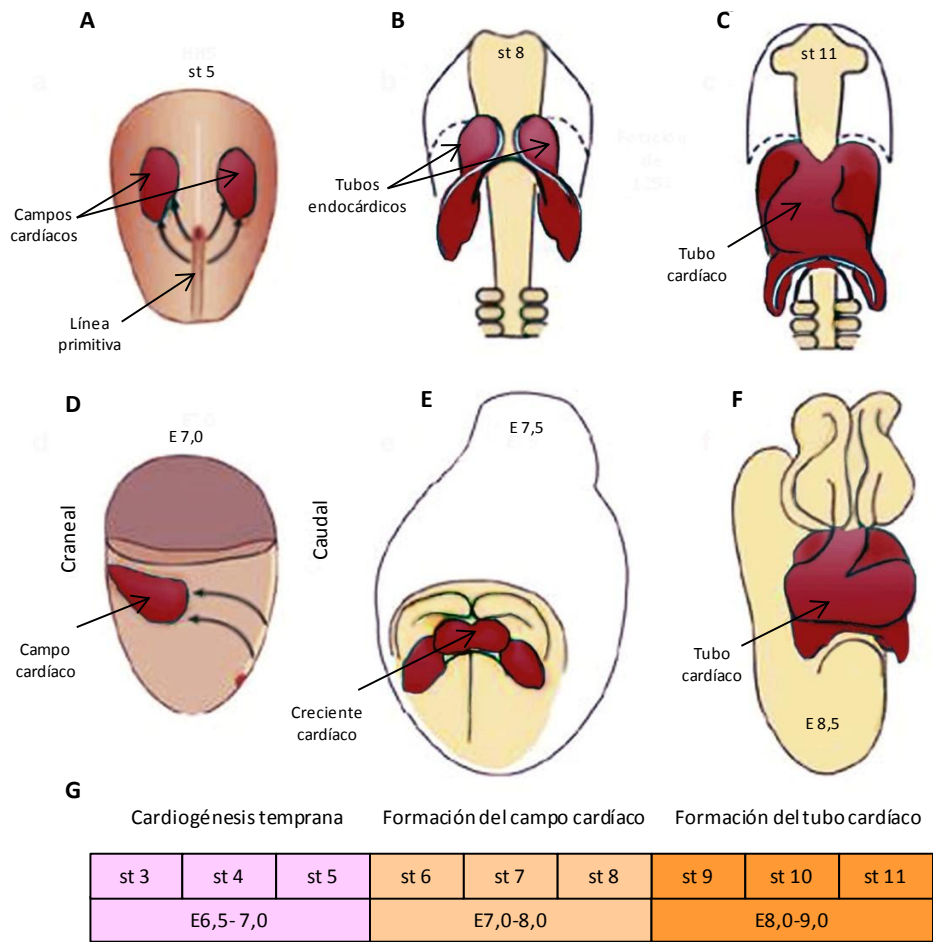


Figura 6. Representación esquemática de la formación del tubo cardíaco en el embrión de pollo (A, B, C) y de ratón (D, E, F). Los embriones se muestran por su parte ventral, excepto en D, donde el embrión se muestra por su parte lateral. El embrión de pollo de st 5 (A) presenta las dos áreas cardiogénicas (en rojo) bien separadas de la línea media, mientras que en el embrión de ratón de E7,0 (D) las dos áreas cardiogénicas se encuentran unidas a través de la línea media. En C y F, el tubo cardíaco comienza su torsión, a la vez que empieza a latir. En G, se describen los eventos más significativos relacionándolos con los estadios correspondientes en pollo y ratón. (Modificado de Abu-Issa y Kirby, 2007).

Este tubo realiza una torsión a la derecha y hacia la región anterior, dando lugar al asa cardíaca (Fig. 6C y F) (Abu-Issa *et al*, 2004; Abu-Issa y Kirby, 2007). El latido comienza en esta etapa, al principio de manera asincrónica. En estos estadios (st 12-17), el tubo cardíaco primitivo está constituido por una capa celular interna de endocardio (derivado de precursores endoteliales que se forman a partir del mesodermo esplácnico) y una capa externa de miocardio (músculo estriado cardíaco), separadas por la gelatina cardíaca.

Posteriormente a la torsión del tubo cardíaco, comienza el proceso de especificación de las cámaras, la septación y la formación de válvulas, generando un corazón tetramérico en aves y mamíferos que puede soportar una doble circulación sistémica y pulmonar.

3.4.2. La especificación de los progenitores cardíacos y su destino en la organogénesis.

La posición de las células precardiácas a lo largo de la línea primitiva está relacionada con su destino en el tubo cardíaco primitivo. De esta manera, las células que migran más rostralmente contribuyen a la región anterior del tubo cardíaco, mientras que las más caudales contribuyen a la región posterior (García-Martínez y Schoenwolf, 1993; López-Sánchez *et al* 2001 y 2009).

Recientemente se ha distinguido entre precursores cardíacos del campo cardíaco primario y secundario. Esta distinción hace referencia a diferentes momentos de diferenciación de los precursores cardíacos, definidos por la expresión de *Islet 1* (ISL1), ya que estudios recientes muestran que ambos campos se originan a partir del mesodermo esplácnico (revisado en Abu-Issa y Kirby, 2007 y 2008; Dyer y Kirby, 2009). La posición de los precursores celulares en los campos cardíacos refleja también su contribución a la formación de las futuras cámaras cardíacas.

El campo cardíaco primario constituye la primera población de células mesodérmicas que se diferencian para formar el tubo cardíaco primitivo y contribuye a la formación del ventrículo izquierdo y parte de las aurículas (Abu-Issa y Kirby, 2007 y 2008; Dyer y Kirby, 2009). Cuando comienza el proceso de torsión, el tubo cardíaco crece mediante la incorporación progresiva de precursores del campo cardíaco secundario al extremo anterior y posterior del tubo cardíaco (de la Cruz *et al*, 1977; Waldo *et al*, 2001; Kelly *et al*, 2001; Moorman y Christoffels, 2003; van Wijk *et al*, 2009; van der Berg *et al*, 2009). Esta población de precursores da lugar a la formación del tracto de salida, parte de las aurículas y ventrículo derecho (Waldo *et al*, 2001; Dyer y Kirby, 2009). La expresión de *Is1* comienza en los campos cardíacos situados en el mesodermo lateral en st 4 (Yuan y Schoenwolf, 2000). En st 8-9, durante la progresiva fusión de los tubos endocárdicos, la expresión de *Is1* continúa en el tubo naciente. Al comienzo del latido y la torsión del tubo, la expresión de *Is1* se pierde en el miocardio en diferenciación, pero permanece en los precursores del campo cardíaco secundario situados en estos estadios (st 12) en el mesodermo faríngeo (Yuan y Schoenwolf, 2000).

3.4.3. Establecimiento de la identidad anterior y posterior en el tubo cardíaco primitivo.

El miocardio del tubo cardíaco primitivo sufre una profunda remodelación por la que dará lugar a la formación del corazón tetracameral (Lamers *et al*, 1992; Soufan *et al*, 2006).

Las primeras evidencias de la regionalización del tubo cardíaco primitivo en el embrión de pollo aparecen próximas al inicio de la torsión del tubo cardíaco, con la progresiva restricción de la cadena pesada de la miosina auricular (AMHC-1; del inglés *auricular myosine heavy chain 1*) a la región más posterior del tubo cardíaco, o región de entrada (De Jong *et al* 1987). Así mismo, el factor de transcripción caja-T 5 (TBX5; del inglés *T-box 5*) que comienza a expresarse en todo el creciente cardíaco, se concentra en la región posterior, mientras que se reprime en la región anterior (Bruneau *et al*, 1999). Por el contrario, la cadena pesada de la miosina ventricular (VMHC-1; del inglés *ventricular myosine heavy chain 1*), que tiene una expresión generalizada en las primeras etapas de la diferenciación cardíaca, se restringe a la región más anterior del tubo, o región de salida (Somi *et al*, 2006). El factor de transcripción *Iroquois 4*

(IRX4), cuya expresión está restringida a la región anterior del tubo cardíaco, regula positivamente la expresión de *Vmhc-1* e inhibe la de *Amhc-1* (Bao *et al*, 1999).

En ratón, el proceso de regionalización comienza después del proceso de torsión (Kelly *et al*, 1999). Así, la cadena ligera de miosina 2V (MLC2V; del inglés *myosine light chain 2V*) y la cadena pesada de miosina β (β MHC; del inglés β *myosine heavy chain*) pasan a ser isoformas ventriculares en los estadios E8.5 y E10.5 respectivamente (Lyons *et al*, 1990; O'Brien *et al*, 1993; Chen *et al*, 1998).

Además de la regionalización en la expresión de algunos genes, los cardiomiocitos auriculares y ventriculares muestran diferencias en su actividad contráctil y electrofisiológica, lo cual es esencial para el funcionamiento correcto del corazón (Yutzey *et al*, 1994; Pawlosky-Dahm *et al*, 1998; Buck *et al*, 1999).

Varios estudios han mostrado que el ácido retinoico (AR) es una molécula esencial en la regionalización del tubo cardíaco primitivo (Mendelsohn *et al* 1994; Yutzey *et al*, 1994; Liberatore *et al*, 2000; Hochgreb *et al*, 2003; Xavier-Neto *et al*, 2001). Los niveles del AR presentan un gradiente postero-anterior que está determinado por la restricción caudal de la expresión de la retinaldehído deshidrogenasa-2, enzima limitante de la síntesis del AR (Tomanek y Runyan, 2001; Larsen, 2003). La aplicación de un exceso de AR en el tubo cardíaco del embrión de pollo provoca una expansión del dominio de expresión de genes caudales como *Amhc-1*. Además, paralelamente se produce una disminución de la expresión de genes rostrales como *Vmhc-1*. De manera similar, en el embrión de ratón, el AR también controla el establecimiento del patrón anteroposterior del tubo cardíaco, afectando a la expresión de *Isl1* y del factor de crecimiento de fibroblasto 8 (FGF8; del inglés *fibroblast growth factor 8*) (Sirbu *et al*, 2008). Además, el tratamiento intrauterino con AR expande la expresión de genes auriculares hacia la zona anterior del tubo cardíaco (Larsen, 2003).

Paralelamente a la regionalización del tubo cardíaco y especificación cameral, el corazón comienza a formar el tejido de conducción que es capaz de generar y transmitir el impulso eléctrico responsable del latido cardíaco. El sistema de conducción incorpora para su formación regiones del miocardio primario en las que se altera la expresión génica original del programa cardíaco (Tomanek y Runyan, 2001; Moorman y Christoffels, 2003; Moorman *et al*, 2005).

3.4.4. Endocardio, proepicardio y epicardio.

El endocardio, capa celular más interna del corazón (Fig. 7), proviene del mesodermo precardiaco. Sus células son similares a las células endoteliales de los capilares sanguíneos. Se ha demostrado que el endocardio influye en la función contráctil del miocardio regulando la composición del medio extracelular de los cardiomiocitos. También, se ha mostrado un papel activo en la formación de las almohadillas endocárdicas que participan en la septación del corazón y en la formación de las válvulas (Maschhoff y Baldwin, 2000; Wagner y Siddiqui, 2007). Así mismo, el endocardio adulto está involucrado en procesos de hipertrofia cardíaca (Deschamps y Spinale, 2005).

En el tubo cardíaco primitivo, el endocardio y el miocardio permanecen separados por una matriz extracelular, la gelatina cardíaca (Fig. 7), muy rica en fibronectina, colágeno y laminina (Nakajima *et al*, 1997). Es producida principalmente por el miocardio y en menor parte por el endocardio (Kelley, 1993; Waldo *et al*, 1999). Esta gelatina media las interacciones entre miocardio y endocardio, e interviene también en la formación de los septos y las almohadillas endocárdicas (Carlson, 2009).

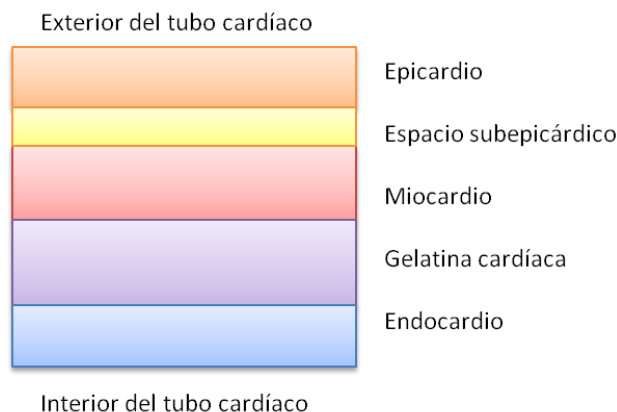


Figura 7. Diferenciación de la pared cardíaca. Se destacan en el esquema las capas del tubo cardíaco.

Mientras se completa el plegamiento del asa cardíaca (st 17-18 en el embrión de pollo), el corazón incorpora otra capa tisular, el epicardio (Wessels y Pérez-Pomares, 2004). Miocardio y epicardio se encuentran también separados por otra capa de matriz extracelular denominada espacio subepicárdico (Fig. 7). El epicardio se forma a partir del proepicardio, una estructura embrionaria transitoria que, además del epicardio, da lugar a la formación de la vasculatura coronaria (Pérez-Pomares *et al*, 2009; Fig. 8B).

El proepicardio se desarrolla a partir del epitelio celómico que aparece entre el límite del primordio hepático y la región de entrada del corazón. Se caracteriza por expresar *Wt1* (del inglés *Wilms' tumor*), *epicardina* y *Tbx18*, genes relacionados también con el desarrollo vascular de los glomérulos renales (Muñoz-Chápuli *et al*, 2002). Presenta múltiples digitaciones o protrusiones, formadas por células epiteliales y, en menor medida, mesenquimáticas (Pérez-Pomares *et al*, 1997). En el embrión de pollo, el crecimiento del proepicardio presenta una asimetría izquierda-derecha, desarrollándose únicamente en el lado derecho del polo posterior del tracto de entrada (Fig. 8A). En el lado izquierdo se forma un proepicardio vestigial que se pierde por apoptosis. Este proceso parece controlado por *FGF8* y *Sna1*, reguladores génicos de la determinación de la asimetría en la formación del polo posterior del corazón (Schlueter y Brand, 2009).

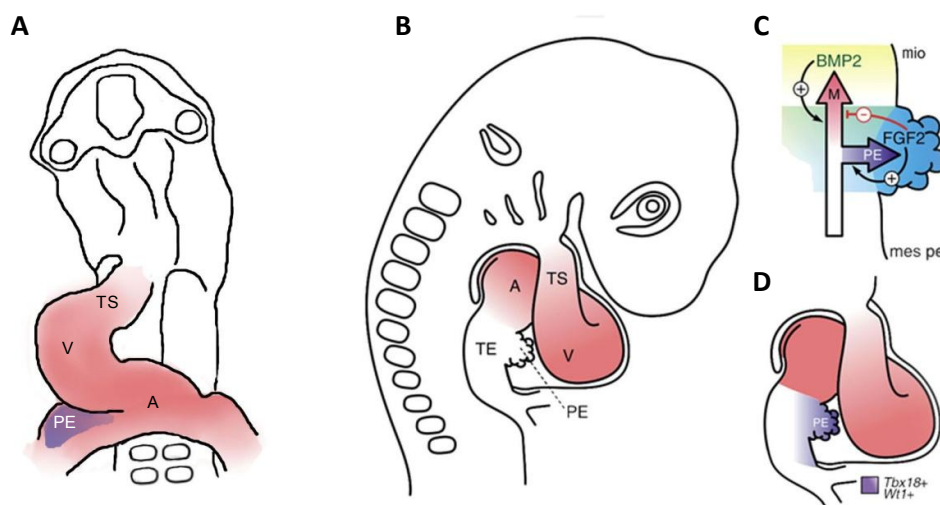


Figura 8. Representación esquemática del desarrollo del epicardio. A. Vista frontal del tubo cardíaco (en rojo) de un embrión de st 12. Se destaca la localización de los precursores del proepicardio (PE; violeta) en el asta derecha del polo posterior. B. Vista lateral de la porción anterior de un embrión de pollo en st 17 que muestra la localización del PE próxima al tracto de entrada (TE) del corazón. C. La señalización mediada por FGF2 (en azul) es esencial para la especificación del linaje proepicárdico (flecha violeta) y contrarresta la señalización de BMP2 (verde) que dirige la diferenciación del mesodermo pericárdico hacia cardiomiocitos del TE (flecha roja). D. La expresión de *Tbx18* y de *Wt1* puede ser detectada en el PE. A: aurícula; mes pe: mesénquima pericárdico; PE: proepicardio; mio: miocardio; TS: tracto de salida; TE: tracto de entrada; V: ventrículo. (Modificado de González-Rosa *et al*, 2010).

En st 17-18, las células del proepicardio del embrión de pollo interaccionan con el miocardio iniciando un proceso de migración y diferenciación, dando lugar a la formación del epicardio primitivo. Posteriormente, parte de las células del epicardio primitivo sufren una transición epitelio-mesénquima a través del espacio subepicárdico, y posteriormente se diferencian a linaje fibroblástico y muscular liso, contribuyendo a la formación de la vasculatura coronaria (Pérez-Pomares *et al*, 2009). Además de participar en la formación de los tejidos vascular y conectivo del corazón, las células derivadas del epicardio desempeñan un papel modulador esencial para la formación de la capa compacta ventricular del miocardio, un papel que podría estar regulado por el factor de transcripción WT1 y la producción de AR (Muñoz-Chápuli *et al*, 2002).

Usando cultivos de explantes de proepicardio, se ha mostrado que las células del proepicardio tienen el potencial de diferenciar a células del músculo cardíaco (Kruithof *et al*, 2006). Experimentos recientes muestran que el balance entre las vías de señalización de la proteína morfogenética de hueso (BMP; del inglés *bone morphogenetic protein*) y FGF determina la diferenciación de los precursores del mesodermo pericárdico (Fig. 8C). Así, la vía

de BMP activa la diferenciación a cardiomiocitos mientras que la de FGF estimula la diferenciación a linaje epicárdico (van Wijk *et al*, 2009; González-Rosa *et al*, 2010). También la señalización de la vía de NOTCH1 regula la diferenciación celular del proepicardio y del mesodermo pericárdico adyacente. La inhibición de la expresión de *Notch1* en el linaje epicárdico inhibe la formación de las arterias coronarias. Por otro lado, esta inhibición reduce la proliferación de los cardiomiocitos y el grosor de la pared miocárdica, poniendo de manifiesto la estrecha relación existente entre epicardio y miocardio (del Monte *et al*, 2011).

Así mismo, el AR interviene de manera directa en la diferenciación del proepicardio. La inactivación del receptor de retinoico α en el proepicardio en mutantes nulos y en mutantes condicionales afecta gravemente al desarrollo epicárdico (Merki *et al* 2005; González-Rosa *et al* 2010). Además, se ha visto que un exceso de AR y del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF; del inglés *vascular endothelial growth factor*) retrasa la diferenciación a células musculares lisas coronarias a partir de las células derivadas del epicardio (Azambuja *et al*, 2010).

3.5. Redes de regulación génica en el desarrollo cardíaco.

Entre las primeras señales responsables de la especificación de los progenitores cardíacos se encuentran las provenientes del endodermo faríngeo y tejidos adyacentes al mesodermo, como el ectodermo y la notocorda (Schulteiss *et al* 1995; Ehrman y Yutzey, 1999; Brand, 2003; Fig. 9A).

El endodermo se encuentra en contacto cercano con los campos cardíacos y se caracteriza por la expresión de los factores *Sox17* (del inglés *SRY-related HMGbox 17*) y *Hex* (del inglés *haematopoietically expressed homeobox*) (Brand, 2010). La señalización proveniente del endodermo a través de los miembros de la superfamilia de factores de transformación y crecimiento β (TGF β ; del inglés *transforming growth factor* β), como la subfamilia BMP y del FGF, promueve la diferenciación a miocardio (Sugi y Lough, 1995) (Fig. 9A). Los FGF tienen un efecto cardiogénico en regiones en las que la señalización por BMP también se encuentra presente (Abu-Issa y Kirby, 2007). De esta manera, los FGF en combinación con BMP2 pueden incluso reespecificar el mesodermo lateral posterior del embrión de pollo dirigiéndolo a la formación de corazón (Marvin *et al*, 2001).

Producidos también por el endodermo, el factor de transcripción SHH (del inglés *sonic hedgehog*) y el factor CRESCENT inducen cardiogénesis en el mesodermo esplácnico, en contacto íntimo con el endodermo faríngeo (Brand, 2003). Además, el factor WNT 11 (del inglés *wingless-type MMTV integration site family member 11*), que no señala vía β -catenina, activa también el programa de diferenciación cardíaca (Solloway y Harvey, 2003).

Por el contrario, algunos factores de la familia WNT secretados por el ectodermo que actúan vía β -catenina (vía canónica) inhiben la diferenciación cardíaca (Marvin *et al*, 2001; Fig. 9B). De este modo, la modulación de la actividad de WNT a lo largo del eje anteroposterior del embrión temprano de pollo establece competencia para formar corazón o células sanguíneas en respuesta a señales de BMP (Schulteiss *et al* 1997; Olson, 2006).

Adicionalmente, desde la notocorda también se secretan otros factores inhibidores de la cardiogénesis, como NOGINA y CORDINA (Brand, 2003). La exposición a la secreción de NOGINA, que antagoniza la señalización a través de BMP, inhibe completamente la diferenciación del mesodermo precardiaco (Schulteiss *et al*, 1997; Schneider y Mercola, 2001).

De esta manera, en el inicio del proceso de diferenciación cardíaca en vertebrados el balance entre señales positivas (como pueden ser los BMP o FGF) y negativas (como la vía canónica de WNT) define la activación del núcleo central de factores de transcripción que promueven la diferenciación a miocardio (Fig. 9B).

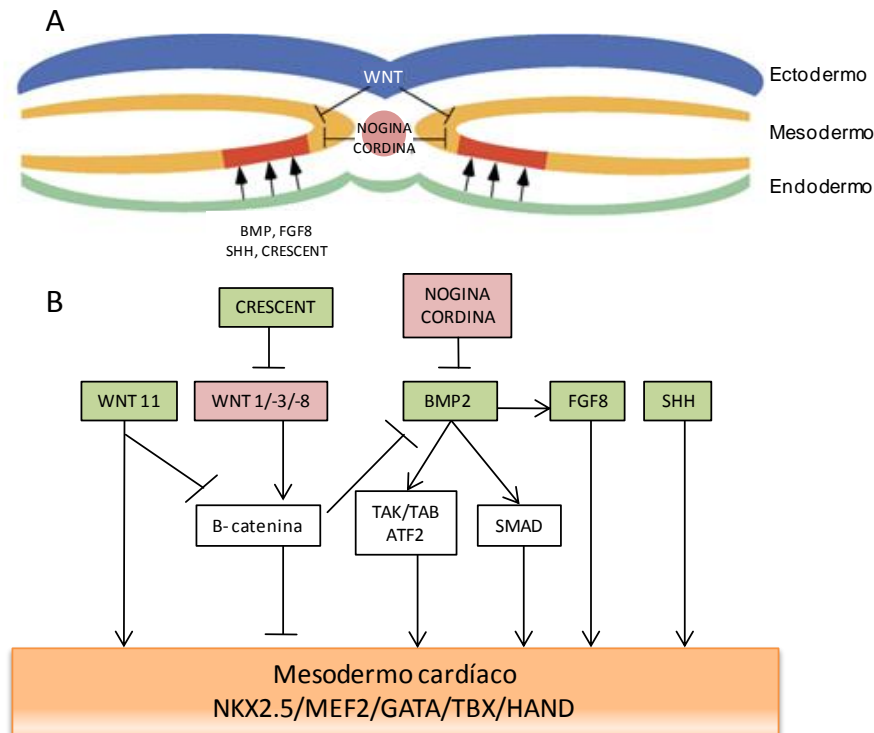


Figura 9. A. Relación espacial entre los factores de inducción cardíacos, segregados principalmente por el endodermo faríngeo (verde) y factores inhibitorios secretados por el ectodermo (azul) o por la notocorda (rosa). El mesodermo cardiogénico (rojo) se forma en el mesodermo esplácnico, el cual permanece en contacto íntimo con el endodermo faríngeo. B. Diagrama que muestra las principales rutas de señalización implicadas en la inducción cardiogénica. Las señales inductoras (en verde: BMP2, FGF8, CRESCENT, WNT 11, SHH) promueven la formación del mesodermo cardíaco a través de la activación de la expresión un núcleo de factores de transcripción cardíacos: *Nkx2.5*, factores *Gata*, *Mef2*, *Tbx* y *Hand*. Existen también señales inhibitorias (en rosa: NOGINA, CORDINA, WNT 1,-3,-8) provenientes de los tejidos adyacentes. Se muestran también rutas particulares de señalización con una función demostrada en inducción cardíaca (en blanco). (Modificado de Brand, 2003).

El núcleo de factores de transcripción cardíacos forma parte de una red génica muy conservada en la evolución, y está constituido por *Nkx2.5*, *Mef2* (del inglés *myocyte-specific enhancer factor*), *Gata* (del inglés *globin transcription factor*), *Tbx* y *Hand* (del inglés *heart and neural crest derivatives expressed*) (Fig. 9B). Este grupo de factores de transcripción opera sin

un único gen maestro, ya que es la interacción de todos los componentes la que estabiliza y refuerza el programa cardíaco (Olson *et al*, 2006; Zaffran *et al*, 2002; Buckingham *et al* 2005). Las señales desde el endodermo faríngeo (Brand *et al* 2003, Abu-Issa *et al* 2007) activan la expresión temprana en el creyente cardíaco del gen *Nkx2.5* (Lien *et al*, 2002), que coopera con otros factores de transcripción, como GATA4, el factor de respuesta al suero (SRF; del inglés *serum response factor*) y TBX5 (Evans, 1999), regulándose mutuamente mediante bucles de retroalimentación positiva (Srivastava y Olson, 2000). La activación de *Nkx2.5* activa a su vez la expresión de otros genes específicos del miocardio, como *Mef2C*, troponina cardíaca I (cTNL; del inglés *cardiac troponine I*), troponina cardíaca C (cTNC; del inglés *cardiac troponine C*), α -actina cardíaca o proteínas de los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (Nicholas y Philipson, 1999).

Las señales inductoras del endodermo faríngeo actúan sobre precursores del campo cardíaco primario y secundario, aunque la coordinación en la señalización celular requerida para regular la proliferación, la migración y la diferenciación del campo cardíaco secundario es diferente y más compleja (Dyer y Kirby, 2009; Hutson *et al*, 2010).

A pesar de que no se ha caracterizado el programa génico responsable del proceso de la torsión del asa cardíaca, se ha propuesto que genes encargados de establecer la asimetría izquierda-derecha están involucrados en este proceso. Por ejemplo, la expresión de *Activina-B* en el nódulo de Hensen en embriones en gastrulación (st 5) inhibe la expresión de *Shh* únicamente en la mitad izquierda del embrión (Levin *et al* 1995, 1997). Esta expresión asimétrica afecta entre otros factores a la expresión de *Pitx2* (del inglés *paired-like homeodomain*), un gen con un marcado protagonismo en el establecimiento de la torsión cardíaca (Yu *et al*, 2001).

Además de las redes descritas, en nuestro grupo hemos comenzado a estudiar nuevos factores con marcado protagonismo en procesos puntuales del desarrollo del corazón. Estos factores también se interrelacionan con las vías clásicas de diferenciación cardíaca, como se describe a continuación.

3.6. La expresión y la función de la TH en el desarrollo cardíaco.

Estos estudios fueron iniciados en nuestro grupo por el Dr. Óscar Bártulos en colaboración con la Dra. Carmen López (Universidad de Extremadura). Los resultados iniciales se resumen brevemente a continuación, y serán presentados más extensivamente en el apartado de Resultados para facilitar el seguimiento de los nuevos datos.

Mediante hibridación *in situ* (HIS) se localizó la expresión de *Th* en el tejido precardiaco y cardíaco del embrión de pollo. En los estadios previos a la formación del tubo cardíaco (st 8 y st 9), el mRNA de la *Th* se encuentra en el mesodermo esplácnico de los tubos endocárdicos. En el tubo cardíaco primitivo (st 12), el transcrito de la *Th* se concentra en su parte posterior, específicamente en la capa miocárdica de la región de entrada. Este patrón de expresión es similar al de otros genes cuya expresión también se restringe progresivamente a la parte posterior del tubo cardíaco (*Amhc-1* y *Tbx5*).

La implicación de la TH en cardiogénesis se puso de manifiesto mediante estudios de ganancia y pérdida de función. Así, microesferas impregnadas con L-DOPA o dopamina inducían la

expresión ectópica de genes cardíacos. Además, la sobreexpresión de la *Th* mediante electroporación indujo la expansión de genes con restricción posterior (*Amhc-1* y *Tbx5*) hacia la región anterior del tubo cardíaco. Por otro lado, la inhibición de *Th* mediante morfolidos disminuyó la expresión de *Amhc-1* y *Tbx5*, y modificó el proceso de curvatura del tubo cardíaco en desarrollo (López-Sánchez *et al*, 2010).

En el embrión de ratón también se detectó expresión de la *Th* desde etapas de gastrulación (López-Sánchez *et al*, 2010). Además, ha sido posible relacionar la ruta de síntesis de catecolaminas con la fisiología cardiovascular. El ratón nulo para la *Th* es letal embrionario y muere por fallo cardíaco entre los días embrionarios E11,5 y E15,5 (Zhou *et al*, 1995).

3.7. La expresión y la función de la proinsulina en el desarrollo cardíaco.

A pesar del mejor control metabólico de las madres diabéticas, la prevalencia de malformaciones cardiovasculares es hasta cinco veces más alta en los hijos de madre diabética (Wren, 2003). Estas malformaciones incluyen miofibrillogénesis aberrante, defectos en la septación cardíaca y otros defectos en la formación de las válvulas cardíacas o del tracto de salida, como la aparición del tronco arterioso persistente (Kumar *et al*, 2007).

En los individuos postnatales también se ha relacionado el crecimiento cardíaco con la ingesta de nutrientes y los niveles de insulina circulante en el organismo (DeBosch y Muslin, 2008). Las pérdidas de masa corporal total se reflejan en un descenso de la masa muscular en el ventrículo izquierdo (de Simone *et al*, 1995), al parecer en respuesta al descenso de los niveles de insulina en suero (Klein, 2001). Además, las cardiomiopatías existentes en la diabetes mellitus de tipo 2 son debidas en gran parte al crecimiento hipertrófico del ventrículo izquierdo, ocurriendo dentro de un contexto de hiperinsulinemia y resistencia a la insulina (Ilercil *et al*, 2002).

La implicación de la insulina en el desarrollo cardíaco ha sido reforzada al observarse el fenotipo de los ratones nulos para IR específicos de corazón, que presentan cardiomiocitos atróficos (Belke *et al*, 2002). Existen numerosos estudios similares que relacionan varios ratones nulos de las vías de señalización de la insulina con un fenotipo cardíaco apreciable, como son los mutantes nulos para el sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1; del inglés *insulin receptor substrate 1*), para el homólogo de tensina y fosfatasa (PTEN; del inglés *phosphatase and tensin homolog*) o para la proteína kinasa B 3 (PKB3; también conocida como AKT3) (revisados en De Bosch y Muslin, 2008). Los mutantes nulos para *Irs-1* presentan un descenso total de la masa corporal, el cual es todavía más acentuado en el caso de la masa cardíaca (Pete *et al*, 1999). Por otro lado, los mutantes nulos para *Pten* y *Pkb3/Akt3* presentan cardiomiocitos hipertróficos (Crackower *et al*, 2002; Taniyama *et al*, 2005).

A lo largo de las últimas dos décadas, el estudio de la insulina y de su forma precursora y embrionaria, la proinsulina, ha sido la labor principal de nuestro grupo de investigación. Los transcritos de proinsulina descritos en el apartado 3.2 presentan una regulación dinámica durante el desarrollo cardíaco. En st 4, se expresa principalmente la isoforma con el intrón procesado (*Pro1B*). El porcentaje de retención del intrón 1 (*Pro1B1*) se incrementa en el creciente cardíaco (st 8), alcanzando el máximo cuando el tubo cardíaco se ha formado (st 10) (Fig. 10B; Mansilla *et al*, 2005). Es decir, en etapas iniciales de la cardiogénesis se produce el

transcrito capaz de generar bajos niveles de proinsulina, mientras que en el estadio de formación del tubo cardíaco se produce el transcrito que prácticamente no se traduce a la proinsulina.

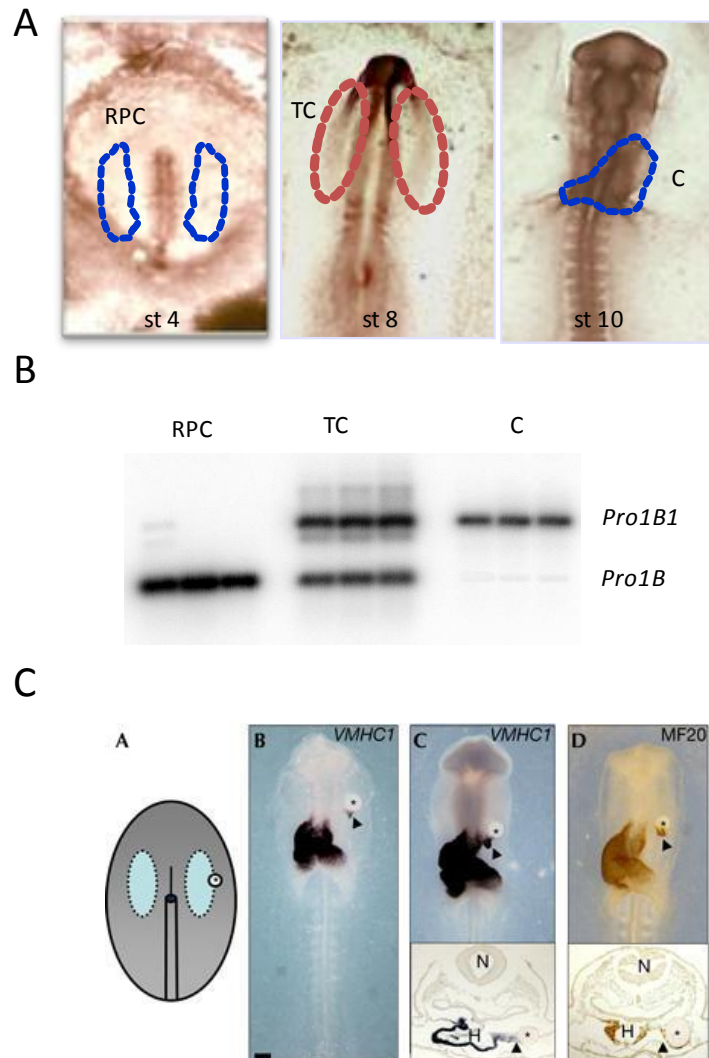


Figura 10. Expresión de las isoformas de mRNA de proinsulina durante la cardiogénesis del embrión de pollo. A. Estadios de embrión de pollo seleccionados para el análisis. Con la línea punteada se delimita la zona cardíaca seleccionada para el estudio. RPC: región precardiogénica; TC: tubos endocárdicos; C: corazón. B. RT-PCR de los transcritos alternativos de proinsulina en las regiones cardíacas del embrión de pollo indicadas en el panel A. C. Efecto de la implantación de microesferas de proinsulina en la expresión de marcadores cardíacos. Se muestra un diagrama donde la microesfera impregnada con proinsulina se implanta en el límite lateral de la región precardiaca en st 5. Hibridación *in situ* (HIS) para *Vmhc-1* (st 10 y st 11) o inmunohistoquímica para la cadena pesada de la miosina (detectada con el anticuerpo MF20) (st 10). El tejido ectópico inducido por la microesfera de proinsulina (señalado con una punta de flecha) expresaba el gen *Vmhc-1* y su proteína, la cadena pesada de miosina. (Modificado de Mansilla *et al*, 2005).

Paralelamente a los nuevos mecanismos de regulación de la expresión embrionaria, se encontró que la proinsulina podría tener un papel en las fases iniciales de la cardiogénesis. Microesferas impregnadas con proinsulina inducían la expresión ectópica de marcadores cardíacos como *Vmhc-1*, un marcador de cardiomiocitos diferenciados del ventrículo (Fig. 10C). Esta inducción también se puso de manifiesto con el anticuerpo MF20 para detectar la cadena pesada de la miosina (Mansilla *et al*, 2005). Estos resultados son concordantes con estudios en los que la insulina induce diferenciación cardíaca terminal en explantes de mesodermo precardiaco de codorniz de st 5 (Antin *et al*, 1996; Lough y Sugi, 2000).

4. OBJETIVOS.

4. OBJETIVOS

1. Caracterizar la expresión génica y actividad de la TH en las primeras etapas de la cardiogénesis embrionaria.
2. Estudiar el papel de la TH en el establecimiento de la polaridad anteroposterior del tubo cardíaco. Establecer la relación de la TH y el ácido retinoico en la especificación del patrón anteroposterior.
3. Analizar la expresión génica de la proinsulina en las primeras etapas de la cardiogénesis embrionaria.
4. Caracterizar la función de la proinsulina en la cardiogénesis, y el efecto de su sobreexpresión en la morfogénesis del tubo cardíaco primitivo.

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

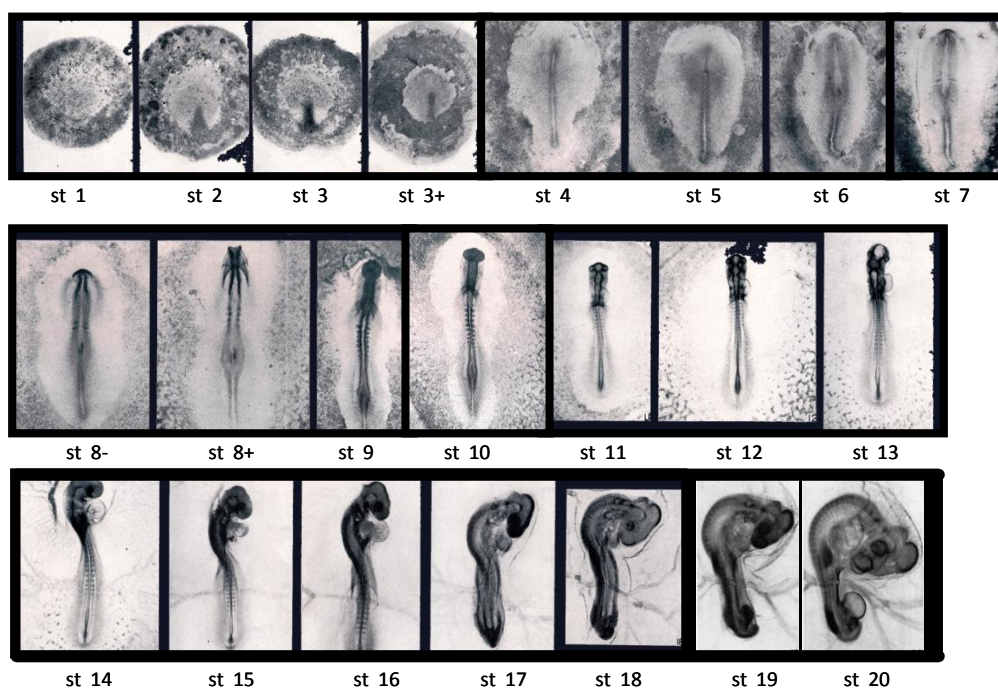
5.1. Animales de experimentación y obtención de tejidos.

Los embriones de pollo fueron obtenidos de huevos marrones fértiles (*Isa Brown*) de la granja Santa Isabel (Córdoba). Los huevos se incubaron a temperatura (38 °C) y humedad constante hasta los estadios embrionarios necesarios según la clasificación de Hamburger y Hamilton (Hamburger y Hamilton, 1951; Fig. 11). Para la obtención de embriones de st 3 a st 20 se utilizaron aros de papel de filtro. Se disecaron primero las membranas y tras sacar al embrión a una placa, se separaron los tejidos requeridos bajo la lupa y con la ayuda de pinzas finas.

Los ratones silvestres utilizados en este estudio fueron de la estirpe C57BL/6 de *Charles River Laboratories International* (EEUU). Todos los animales fueron mantenidos en el Centro de Investigaciones Biológicas, siguiendo la normativa vigente en la Unión Europea. Se mantuvieron en ciclos de 12:12 horas de luz y oscuridad, a una temperatura de 20 °C, comida y bebida *ad libitum*.

El tejido principal de trabajo en el modelo de ratón fue el corazón procedente de embriones comprendidos entre las edades embrionarias 8,5 días (E8,5) y 15,5 días (E15,5). Para la determinación del estadio embrionario, se consideró la mañana en la que se encuentra el tapón vaginal como E0,5. Las hembras preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical y los embriones fueron obtenidos por cesárea. Bajo la lupa, y con la ayuda de unas pinzas finas, se disecaron los corazones embrionarios.

Para el estudio del corazón de ratón postnatal (P25; 25 días tras el nacimiento) el animal se dislocó cervicalmente y se realizó la extracción del corazón.



Estadio de desarrollo	Tiempo de incubación
st 1	
st 2	6-7 hr
st 3	12-13 hr
st 4	18-19 hr
st 5	19-22 hr
st 6	23-25 hr
st 8	26-29 hr
st 10	33-38 hr
st 12	45-49 hr
st 14	50-53 hr
st 16	51-56 hr
st 18	72 hr
st 20	80 hr

Figura 11. Desarrollo temprano del embrión de pollo. A. Se muestran las primeras etapas del desarrollo embrionario (hasta 80 horas de incubación, st 20), incluyendo la formación de la línea primitiva (st 2-st 4), la aparición de las primeras somitas (st 7) y la formación del tubo cardíaco (st 10 en adelante). En la tabla se especifica su correspondencia en tiempo en horas desde el inicio de la incubación. (Modificado de Hamburger y Hamilton, 1951).

5.2. Cultivo de embriones de pollo (método EC).

Los embriones de pollo se estadiaron siguiendo la clasificación de Hamburger y Hamilton. El cultivo de embrión de pollo temprano (cultivo EC; del inglés *early chick*) es una variante mejorada del original cultivo de New, como se ha descrito en Chapman *et al* (2003).

Se abrió el huevo y se descartó la clara. Para la extracción del embrión se utilizó un aro de papel de filtro de 20x20 mm (Whatman, Reino Unido) con cuatro lóbulos simétricos. Esta forma permite que el embrión no pierda la tensión superficial al cortar las membranas vitelinas de alrededor. Tras limpiar de restos de yema en el embrión, éste se dispuso en una placa Petri de 35 mm sobre medio de cultivo semisólido con la zona ventral hacia arriba. El embrión en la placa se incubó a 37 °C y saturado de humedad hasta el estadio deseado. El medio semisólido se compone de: 50% de clara (porción menos densa), 50% de solución salina (7,19 g NaCl/l de agua destilada) y 0,3% de agar bacteriológico. Para su preparación se extrajo la clara menos densa de huevos no incubados y se calentó a 49 °C hasta su uso. La solución salina se llevó a ebullición, y se le añadió el agar en agitación hasta su disolución. Se dejó atemperar a 49 °C durante al menos 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se procedió a la mezcla en agitación de la clara de huevo y la solución salina con el agar. Con una jeringa de 10 ml, se repartieron aproximadamente 2 ml de esta mezcla por placa de cultivo de 35 mm.

5.3. Detección e identificación de RNA mensajero.

5.3.1. RT-PCR semicuantitativa.

Los tejidos o embriones completos se disecaron como se ha descrito en el apartado anterior, se congelaron inmediatamente en nieve carbónica y se guardaron a -80 °C. Posteriormente, se homogeneizaron en *Trizol* (Invitrogen, EEUU) y el RNA se extrajo de

acuerdo con las instrucciones del fabricante. La integridad del RNA fue verificada por electroforesis y se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm.

Para la reacción de transcripción inversa (RT; del inglés *reverse transcription*) se partió de 2,5 a 5 µg de RNA total, previamente tratado con DNaseI (Invitrogen) para eliminar posibles restos de DNA genómico. Generalmente la RT se realizó con los cebadores *Oligo (dT)₁₈₋₂₀* o *Random Primers* y la enzima *Superscript III* (todo de Invitrogen), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para la PCR semicuantitativa se utilizaron 2 µl del producto de RT en un volumen final de 50 µl con la enzima *Taq polymerase* (Invitrogen) y con cebadores específicos (Invitrogen) cuyas secuencias se encuentran en la Tabla 1.

Para la amplificación de los dos transcritos embrionarios de proinsulina en la misma reacción de PCR, se utilizó la pareja de cebadores cAltF1 y cAltR1 (ver además Fig. 24, en Resultados). En el caso de la insulina de ratón, la pareja de cebadores mInsF1 y mInsR1 amplifican tanto la insulina 1 como la insulina 2 (en esta especie el gen de la insulina se encuentra duplicado). De la misma manera, mIRF1 y mIRR1 amplifican las dos isoformas del receptor de insulina.

Cuando el producto de PCR iba a ser clonado se utilizó la enzima *High Fidelity* en la amplificación (Roche Diagnostics, Alemania) para minimizar errores según instrucciones del fabricante.

Nombre	Secuencia 5'-3'	c	Descripción
cAltF1	GAATGGGGAAATTTCTACCACT	+	Pro1B y Pro1B1 (pollo)
cAltR1	GACTGCTCACTAGGGGCTGC	-	Pro1B y Pro1B1 (pollo)
cInsF1	ATATAAATATGGGAAAGAGAATG	+	Proinsulina (pollo) HIS
cInsR1	GTTGCAGTAGTTCTCCAGTT	-	Proinsulina (pollo) HIS
cPro1AF1	CTACCAGTCTTCATCTCTGA	+	Pro1A (pollo)
cProR1	GCTAGTTGCAGTAGTTCTCCAGTT	-	Proinsulina (pollo)
cPro1BF1	ATATAAATATGGGAAAGAGAATG	+	Pro1B (pollo)
cTbx5F1	AAGCTCGTAACATGGCGGAC	+	Tbx5 (pollo) HIS
cTbx5R1	TTAGCTGTTCTCGCTCCACT	-	Tbx5 (pollo) HIS
cTHF1	CACGAGTGAAGATGCCAAC	+	TH (pollo) HIS
cTHR1	CCCTGTTCTAGTCTGTAAAC	-	TH (pollo) HIS
mInsF1	GGCTTCTTCTACACACCCA	+	Insulina (ratón)
mInsR1	CAGTAGTTCTCCAGCTGGTA	-	Insulina (ratón)
mIRF1	GGCCAGTGAGTGCTGCTCATGC	+	Receptor de insulina (ratón)
mIRR1	TGTGGTGGCTGTCACATTCC	-	Receptor de insulina (ratón)

Tabla 1. Cebadores utilizados para la PCR semicuantitativa. En la tabla se especifica si el cebador se une a la cadena (c) sentido (+) o antisentido (-). Se marca con "HIS" en la descripción del cebador cuando el producto de la PCR fue utilizado para el diseño de sondas para hibridación *in situ*.

La identidad de los productos amplificados se verificó mediante secuenciación en el servicio de secuenciación del Centro de Investigaciones Biológicas.

5.3.2. RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR).

La RT se realizó con 2,5 µg de RNA, el kit *Superscript III* y *Random Primers*. La PCR cuantitativa (qPCR; del inglés *quantitative PCR*) se realizó con el *ABI Prism 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems, EEUU) usando *TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG* (Applied Biosystems) y sondas de *The Universal Probe Library* (UPL) (Roche Applied Science) para la detección. La secuencia de los cebadores y sus sondas UPL respectivas se describen en la Tabla 2.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Sond	Descripción
qcINSF1	CCTAGTGAGCAGTCCCTTGC	18	Proinsulina total (pollo)+
qcINSR1	CCTCGCTTGACTTTCTCGTATT		Proinsulina total (pollo)-
qcPro1B1F1	TGGTAAAGAGCTGGCTTGGT	72	Pro1B1 (pollo)+
qcPro1B1R1	GCAATGTGCTCAAAGACCTG		Pro1B1 (pollo)-
qcPro1BF1	GCAAACCTTCTCTGCATCTCTTTCT	136	Pro1B (pollo)+
qcPro1BR1	CCAGAAGAGGCAGTGATCG		Pro1B (pollo)-
qcTHF1	ACAGCCCCCAGACCATCT	80	TH (pollo)+
qcTHR1	AATCAGCGAATGAAGCTCGT		TH (pollo)-
qcGAPDHF1	GTCCTCTCTGGCAAAGTCCA	49	GAPDH (pollo)+
qcGAPDHR1	ACCATGTAGTTCAGATCGATGAAG		GAPDH (pollo)-
qcDBHF1	TACAAGGTGTCCCTCGATCC	66	DBH (pollo)+
qcDBHR1	GCTCGGGGTAAGTACGTT		DBH (pollo)-
qcAMHC1F1	CTTTGTCCGCTGTCTCATCC	12	AMHC-1(pollo)+
qcAMHC1R1	AGGGGGTTGTCCATCACAC		AMHC-1(pollo)-
qcTbx5F1	GATGAGAACACGGCTTTGG	8	TBX5 (pollo)+
qcTbx5R1	AGTCTCGGGGAAGACATGG		TBX5 (pollo)-
qcDrd1F1	TGTCATTAGTGTGGACAGATACTGG	19	Receptor D1 (pollo)+
qcDrd1R1	GGGTCATTTTCTCTCGTACC		Receptor D1 (pollo)-
qcDrd3F1	GATAAGCTCTTTAGGAAGGATAGGC	12	Receptor D3 (pollo)+
qcDrd3R1	CCTAATACAGAGAGCCACTCCAC		Receptor D3 (pollo)-
qcDrd5F1	GTCTGCTGCACTGGAGGTC	27	Receptor D5 (pollo)+
qcDrd5R1	GAATCGTTCGTCTCCGTAGG		Receptor D5 (pollo)-

Tabla 2. Cebadores y sondas utilizadas para la RT-qPCR. En la tabla se especifica si el cebador se une a la cadena sentido (+) o antisentido (-).

5.3.3. Generación de sondas para hibridación *in situ* (HIS).

Las sondas para la proinsulina de pollo (que incluye los exones 1B, 2 y 3), para la TH de pollo y para Tbx5 de pollo se generaron mediante RT a partir del RNA de embrión completo de pollo,

utilizando el kit *Superscript III* (Invitrogen) y *Oligo-DT₁₈₋₂₀* seguida de PCR con los cebadores cInsF1 / cInsR1, cTHF1 / cTHR1 y cTbx5F1 / cTbx5R1 respectivamente (Tabla 1; Hernández-Sánchez *et al*, 2003). Los productos amplificados se clonaron en el vector pCRII-TOPO (Invitrogen). Las sondas para *Amhc-1*, *Vmhc-1* y *Bmp-2* fueron descritas previamente (Bisaha y Bader, 1991; Somi *et al* 2004).

Para la síntesis de la ribosonda, se transcribió a partir de 1 µg de plásmido con la polimerasa adecuada en presencia de 2 µl de una mezcla de nucleótidos uno de ellos marcado con digoxigenina (dUTP) (todo de Roche) y siguiendo las indicaciones del fabricante e incubando a 37 °C durante 2 horas. Para parar la reacción, se añadieron 1,6 µl de etilendiaminotetracético (EDTA) 0,5 M y 16,4 µl de agua libre de RNasas.

La ribosonda se precipitó con 2 µl de cloruro de litio 8 M y 120 µl de etanol frío durante 2 horas a -20 °C. El precipitado se lavó con etanol frío al 70% y finalmente se resuspendió en 50 µl de EDTA 10 mM. Para comprobar la calidad de las sondas generadas, éstas se fraccionaron en geles de agarosa 0,8% (p/v) con bromuro de etidio. La sonda se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm.

5.3.4. Hibridación *in situ* en embriones completos.

Los embriones enteros de pollo se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS (previamente tratado con DEPC y esterilizado en autoclave) durante al menos 16 horas a 4 °C. Se lavaron con PBT (PBS-DEPC y Tween-20 0,25%) y a continuación se deshidrataron pasándolos por una serie de soluciones de metanol en PBT a concentraciones crecientes (25%, 50%, 75%) durante 15 minutos en cada una. En estadios de desarrollo avanzado (st 13 en adelante), se mantuvieron durante 20-30 minutos en cada solución de metanol. Finalmente se lavaron dos veces con metanol 100%, y se guardaron en esta solución a -20 °C hasta su procesamiento.

La rehidratación de las muestras se realizó con las mismas soluciones de metanol en sentido inverso y se lavaron dos veces con PBT antes de continuar con el protocolo.

Para mejorar su permeabilización se trataron 3 veces durante 20-30 minutos (dependiendo del estadio) en solución detergente (1% de IGEPAL, 1% de SDS, 0,5% de deoxicolato, 50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) a temperatura ambiente, y se lavaron después con PBT. Posteriormente, se fijaron de nuevo con PFA 4% en PBS durante 20-30 minutos (dependiendo del estadio), a temperatura ambiente, y se volvieron a lavar con PBT para retirar el fijador.

A continuación se preincubaron los embriones en solución de hibridación durante 2 horas a 65 °C. Esta solución contenía una mezcla de 50% de formamida (Merck), SSC 5X pH 4,5, 2% de BBR (del inglés *Boehringer Blocking Powder*; Roche), 2% de SDS, 100 µg/ml de heparina (Sigma) y 250 µg/ml de tRNA (Sigma). Transcurrido este tiempo, la solución de hibridación fue reemplazada por nueva solución conteniendo la ribosonda, generalmente a 10 µg/ml que previamente había sido desnaturalizada a 80 °C durante 2 minutos, seguidos de 30 segundos en hielo. Alternativamente, los embriones se guardaron a -20 °C en solución de hibridación hasta su procesamiento. Los embriones se incubaron en presencia de la ribosonda durante al

menos 16 horas a la temperatura correspondiente (58-65 °C). Después, fueron lavados 4 veces durante 30 minutos con la solución X (50% formamida, SSC 2X pH 4,5, 1% SDS) a la temperatura de hibridación, seguida por 4 lavados a temperatura ambiente en MABT pH 7,5 (150 mM NaCl, 100 mM ácido maleico, 0,25% Tween-20). Seguidamente se realizaron dos incubaciones de 1 hora en solución de bloqueo (2% de BBR en MABT), a temperatura ambiente, tras las cuales, los embriones se incubaron con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a la fosfatasa alcalina (1:2000 en solución de bloqueo, Roche) durante toda la noche a 4 °C en agitación.

Tras la incubación con el anticuerpo se realizaron 6 lavados de 30 minutos, seguidos de un lavado durante toda la noche con MABT, todos a temperatura ambiente.

Al día siguiente, se continuó con dos lavados con NTMT (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,25% Tween 20). Para la detección del anticuerpo se incubaron las muestras en oscuridad con 4,5 µl de NBT (azul de nitrotetrazolio; Roche) y 3,75 µl de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indosil-fosfato; Roche) en 1 ml de NTMT pH 9,5. Cuando el desarrollo de la tinción fue óptimo, la reacción se paró lavando los embriones con PBT, se fijaron con PFA 4% durante toda la noche y se fotografiaron bajo luz clara.

5.4. Tratamiento con citral.

Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Carmen López Sánchez de la Universidad de Extremadura. Se preparó una solución madre 1 M de citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal; Sigma) en etanol 100%, un inhibidor de la síntesis del AR, y se diluyó en PBS a concentración final 1 mM o 10 mM para su aplicación. Los embriones control recibieron 1% etanol en PBS.

A embriones de pollo de st 5 en cultivo EC, se añadieron 20 µl de la solución de citral o únicamente el vehículo, distribuidos en cuatro gotas de 5 µl en el área precardiogénica del embrión. Los embriones se volvieron a incubar hasta que alcanzaron el st 10-11, se recogieron y fijaron durante toda la noche en PFA 4%, y posteriormente los embriones fueron procesados para HIS.

5.5. Implantación de microesferas.

Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Carmen López Sánchez de la Universidad de Extremadura. Las microesferas son usadas habitualmente en biología del desarrollo por su capacidad de adherir a su superficie diferentes sustancias. Para el tratamiento con dopamina se utilizaron microesferas acrílicas de heparina (150-200 µm de diámetro, Sigma), mientras que para el AR se utilizaron microesferas de resina de intercambio iónico AG1-X2 (150-200 µm de diámetro, BioRad). La dopamina fue disuelta en PBS y el AR *all-trans* fue disuelto en dimetil sulfóxido (DMSO) (ambos de Sigma). Las microesferas de heparina se lavaron 3 veces en PBS durante 10 minutos y se incubaron durante 2 horas, en dopamina 10 µM o en su correspondiente vehículo (PBS), en oscuridad y a 4 °C.

Las microesferas de resina de intercambio iónico AG1-X2 fueron primero incubadas en AR 10 µg/ml durante 20 minutos a temperatura ambiente, seguidas por una tinción en Rojo Neutro 0,05% durante 10 minutos, y lavadas 3 veces en solución salina al 0,9%. En este caso, las microesferas control fueron incubadas en DMSO.

Las microesferas se implantaron en embriones de pollo en cultivo EC (st 5). Con ayuda de unas pinzas finas y una púa de cactus esterilizada, se abrió una pequeña incisión en el endodermo embrionario. La microesfera se depositó a través de esta incisión entre el epiblasto y el endodermo, lateral o medial al campo cardíaco bilateral (Fig. 12).

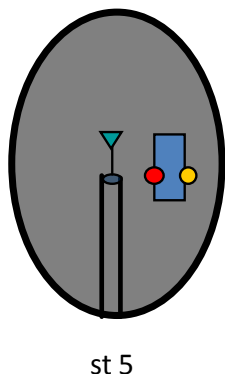


Figura 12. Implantación de microesferas en el embrión de pollo temprano. El esquema corresponde a un embrión en st 5 con una microesfera implantada lateral (círculo amarillo) o medial (círculo rojo) a uno de los campos cardíacos bilaterales.

Tras 6-18 horas de incubación adicional, los embriones se fijaron durante toda la noche en PFA al 4%, se fotografiaron y se procesaron para HIS con el embrión *in toto*.

5.6. Criocortes de embriones completos.

Los embriones fijados en PFA al 4% se embebieron secuencialmente en una disolución de sacarosa al 15% en PBS a 4 °C hasta que el embrión cayó al fondo de la placa, sacarosa al 30% en PBS, en una mezcla 1:1 de 30% sacarosa y material crioprotector OCT (Tissue-Tek Sakura Finetek, Holanda) durante 10 minutos a temperatura ambiente y finalmente en OCT puro durante 10 minutos. Los embriones se congelaron en nieve carbónica y se cortaron al criostato con un grosor de 10 µm. Los cortes se recogieron en portaobjetos cargados positivamente (Thermo Scientific) y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis y fotografiado.

5.7. Análisis por HPLC.

Estos experimentos se realizaron en colaboración con la Dra. Ana Isabel Valenciano, de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid.

Se recogieron embriones de pollo de st 8 y de st 10 en 100 µl de 0,3 N HClO₄, conteniendo 0,4 mM bisulfito de sodio y 0,4 mM EDTA. Se añadió dihidroxi-benzilamina (DHBA) 100 pmol/ml como normalizador interno. Las muestras se sonicaron y centrifugaron a 15.000 g durante 5 minutos a 4 °C. El contenido de catecolaminas en 40 µl de la fracción sobrenadante se cuantificó por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC; del inglés *high performance liquid chromatography*) con detección colorimétrica, según lo descrito en De Pedro *et al* (1997), con las siguientes modificaciones: la fase móvil estaba constituida por 10 mM ácido fosfórico, 0,1 mM EDTA, 0,4 M octanosulfonato de sodio y 3% acetonitrilo pH 3,1. El potencial del

electrodo analítico fue de 200 mV. Las proteínas insolubles en HClO_4 se resuspendieron en 0,5 N NaOH, y se cuantificaron mediante el Método de Lowry.

5.8. Electroporación de células precardiácas en la línea primitiva.

Los experimentos de electroporación se realizaron en colaboración con la Dra. Carmen López de la Universidad de Extremadura y algunos en paralelo con el Dr. Óscar Bártulos (doctorando de nuestro grupo) y la Dra. Esther Hernández. Para la electroporación, hemos utilizado una técnica modificada previamente descrita por Colas y Schoenwolf (2003).

Embriones en cultivo EC de st 3 o st 3⁺ se transfirieron con la parte ventral hacia arriba a una placa Petri con el electrodo de tungsteno (cátodo) (2 mm de largo y 100 μm de diámetro; CUY701P2E, Nepagene) embebido en agarosa y cubierto con suero salino (Fig. 13). La línea primitiva del embrión se alineó con el cátodo. Después, se microinyectó 0,1-0,2 μl de la solución con el plásmido (ver más abajo; Fig. 13) usando un microinyector Inject+Matic (Génova) en la región más rostral del segundo tercio de la línea primitiva. Inmediatamente tras la inyección de DNA, el ánodo (con forma de L, de platino, 2 mm de largo y 300 μm de diámetro, CUY613P2, Nepagene) se situó por encima del área de la línea primitiva, y se aplicaron una serie de 5 pulsos de onda cuadrada (con una duración de 40 ms a 5V con intervalos de 999 ms) usando un Electroporador Ovodyne de onda cuadrada TSSS20 (Intracel).

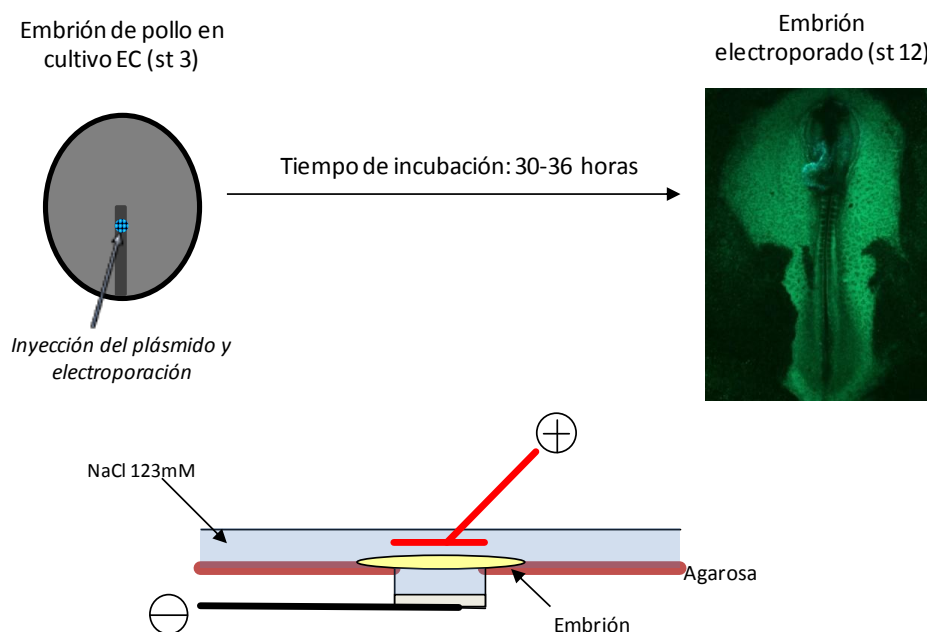


Figura 13. Electroporación de embriones de pollo tempranos (método modificado de Colas y Schoenwolf). Se muestra en el esquema de la placa de electroporación y la posición del embrión, con la parte ventral hacia arriba, sobre la placa de agarosa con suero salino. El plásmido a electroporar se inyectó en el primer tercio de la línea primitiva. Tras ello, se aplicaron 5 pulsos eléctricos.

La mezcla del plásmido, preparada inmediatamente antes de la electroporación, contenía plásmido a una concentración de 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1/10 volumen de sacarosa 60% (p/v) y un volumen de colorante *fast green* FCF 0,5% (p/v).

Tras la electroporación, los embriones se transfirieron de nuevo a la placa de cultivo con la mezcla de agar y clara, y se mantuvieron en el incubador hasta su procesamiento. Los embriones se fotografiaron bajo luz clara y fluorescente (Nikon digital, SIGHT DS-U1), o únicamente bajo luz fluorescente (Leica, Leica AppSuite). Los embriones se seleccionaron por la localización y extensión de la electroporación. Los embriones seleccionados se fijaron en PFA 4% si se procesaron para HIS con el embrión *in toto*, o se congeló al embrión o la región de interés a -80 °C si se requería para el aislamiento de RNA o proteína.

5.9. Generación de las construcciones con el plásmido pCAGs-I-GFP.

Los cDNA de las diferentes isoformas de proinsulina de pollo (*Pro1A*, *Pro1B* y *Pro1B1*) se subclonaron en el plásmido bicistrónico pCAGs-I-GFP (Fior y Henrique, 2005) a partir de construcciones previamente descritas (Hernández-Sánchez *et al*, 2003; Mansilla *et al*, 2005) mediante el uso de enzimas de restricción. Las construcciones de los transcritos de proinsulina a los que se les había fusionado el epítipo V5 en el extremo 5' se describen en Hernández-Sánchez *et al* (2003). Se subclonaron en el vector bicistrónico pCAGs-I-GFP mediante enzimas de restricción.

El cDNA de la *Th* se amplificó mediante RT-PCR con los cebadores cTHF1 y cTHR1. El producto amplificado, cuya identidad se verificó mediante secuenciación, se clonó en el vector pcrII-TOPO, del que fue escindido con *EcoR1* y subclonado en pCAGs-I-GFP tras cortarlo con esa misma enzima.

5.10. Extracción proteica e inmunodetección en membrana (Western Blot).

Para la extracción de proteína, los embriones completos se homogenizaron en 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100 y el cóctel de inhibidores de proteasas *mini EDTA free* (Roche). Los homogeneizados se mantuvieron 15 minutos en agitación a 4 °C y se clarificaron por centrifugación, y la cuantificación de proteína se realizó con el *Kit BCA protein assay* (Pierce, EEUU). El extracto proteico se fraccionó en un gel de acrilamida al 15% y se transfirió a membranas de PVDF mediante un sistema de transferencia húmeda (Biorad, EEUU). Las membranas se bloquearon con 5% de leche en PBST (PBS y 0,05% Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para la detección del epítipo V5, la membrana se incubó con el anticuerpo anti-V5 1:1.000 (Invitrogen) durante 16 horas a 4 °C, seguido de una incubación con anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Sigma), 1:10.000 durante 1 hora. Los anticuerpos se prepararon en 1% BSA en PBST y los lavados entre anticuerpos se realizaron con PBST. Finalmente se reveló la señal con el sistema *SuperSignal* (Pierce) exponiendo la membrana a películas *Kodak WG*. Tras el revelado, para posteriores usos de la membrana, se realizó una limpieza con una solución 0,1% rojo *Ponceau S* en 5% de ácido acético durante 30 minutos.

Para la detección de la GFP, la membrana se incubó con anticuerpo anti-GFP 1:5.000 (Clontech, EEUU) durante 16 horas a 4 °C, seguido de una incubación con anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Sigma) 1:10.000 durante 1 hora.

Para normalizar la carga relativa, tras lavar con la solución 0,1% de rojo *Ponceau S*, se volvió a hibridar con anticuerpo anti- β -actina 1:10.000 (Sigma) durante 16 horas a 4 °C, seguido de una incubación con anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Sigma) 1:10.000 durante 1 hora.

6. RESULTADOS.

6. RESULTADOS

6.1. Expresión génica de la *Th* durante el desarrollo cardíaco temprano del embrión de pollo. Actividad de la ruta de síntesis de catecolaminas.

En estudios iniciales de nuestro grupo se detectó mediante HIS la expresión de la *Th* en el tejido precardiaco y cardíaco del embrión de pollo. En los estadios previos a la formación del tubo cardíaco (st 8 y st 9) el mRNA de la *Th* se encontró en el mesodermo esplácnico de los tubos endocárdicos (Fig. 14). En el tubo cardíaco primitivo (st 12), los transcritos de *Th* se concentraron en su parte posterior, específicamente en la capa miocárdica de la región generadora de las futuras aurículas (Fig. 14). Este patrón de expresión es similar al de otros genes (*Amhc-1* y *Tbx5*) cuya expresión también se restringe progresivamente a la parte posterior del tubo cardíaco (López-Sánchez *et al.*, 2010).

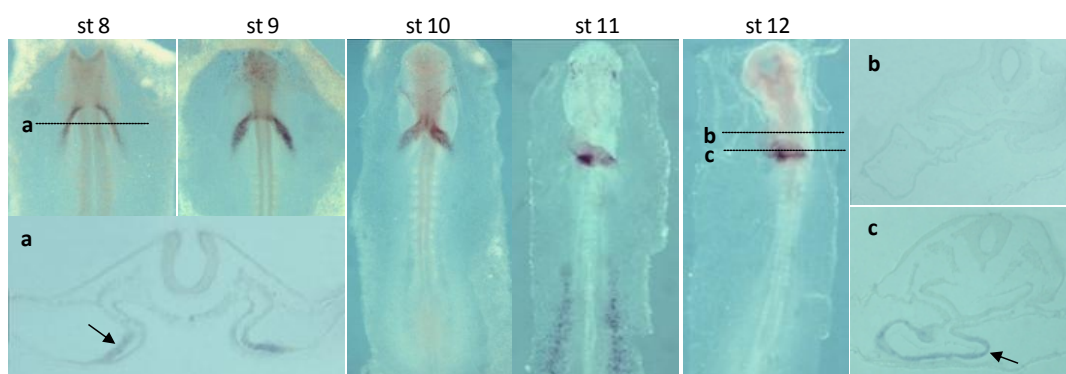


Figura 14. Expresión génica de la *Th* durante el desarrollo cardíaco temprano del embrión de pollo. HIS para *Th* en el embrión completo en estadios 8-12 (de 24 a 46 h de desarrollo); a, b y c: secciones transversales en parafina a los niveles indicados en las líneas correspondientes. En st 8, el mRNA de la *Th* se restringe al mesodermo esplácnico de los tubos endocárdicos, mientras que más tarde se expresa en la capa miocárdica de la región posterior del tubo cardíaco (flechas en a y c). (*Resumen de resultados previos a la elaboración de esta Tesis Doctoral*).

Continuando con estos estudios, en la presente Tesis Doctoral examinamos si la TH detectada en estadios embrionarios previos a la diferenciación neural y adrenal era enzimáticamente activa dentro de la ruta de síntesis de catecolaminas. La TH cataliza la conversión del aminoácido L-tirosina a L-DOPA (Fig. 2; Fig.15A), por lo que se midieron los niveles de L-DOPA mediante HPLC en extractos de embriones completos de st 8, st 10 y st 12. Se detectó L-DOPA desde el estadio en el que se inicia la formación de los tubos endocárdicos (st 8) hasta la torsión del tubo cardíaco primitivo (st 12), aumentando sus niveles a lo largo del desarrollo (Fig. 15B). Estos resultados indican que la TH es funcional durante las etapas iniciales de la cardiogénesis.

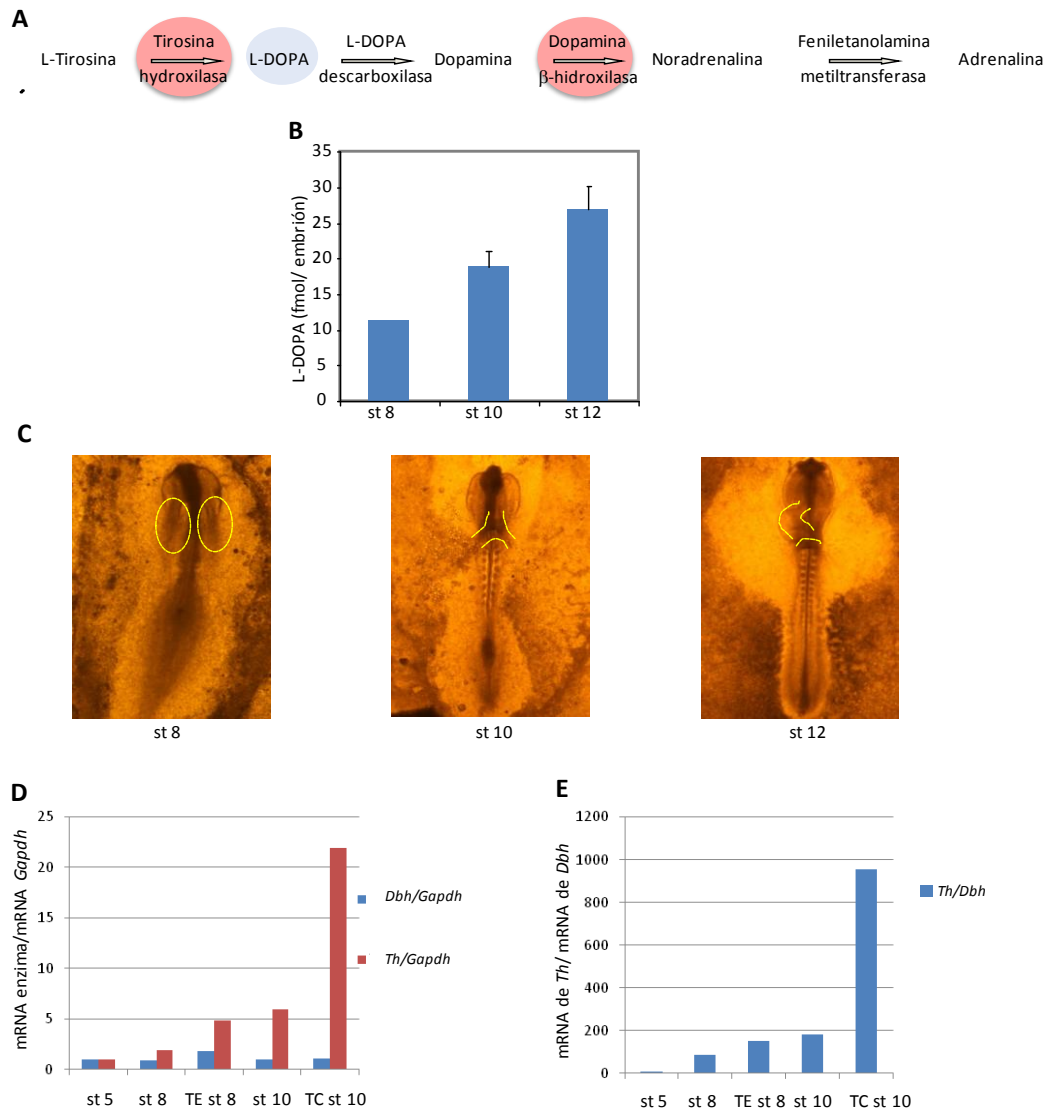


Figura 15. Actividad de la ruta de síntesis de catecolaminas en la cardiogénesis del embrión de pollo. A. Ruta de la síntesis de catecolaminas B. HPLC para L-DOPA en embrión completo. Se midió en extractos de un grupo de 30 embriones de st 8 (fase de tubos endocárdicos), 2 grupos de 15 embriones de st 10 (tubo cardíaco lineal) y dos grupos de 10 embriones de st 12 (inicio de la torsión cardíaca). Los resultados representan, excepto en st 8, la media \pm desviación estándar. C. Estadios embrionarios analizados, con la zona cardiogénica incluida en el estudio delimitada por la línea de puntos. D. RT-qPCR para *Th* y *Dbh* en embrión completo de st 5, st 8, st 10 y en la región cardíaca de st 8 y st 10 (TE, tubos endocárdicos; TC tubo cardíaco). Se ha normalizado la expresión de cada gen respecto a su valor en st 5. E. Relación entre la expresión *Th* y *Dbh* a partir de los datos obtenidos por RT-qPCR.

En estos estadios también se detectó dopamina de manera ocasional. La dopamina es un metabolito inestable cuya detección además es poco sensible por este método, lo cual podría explicar su detección irregular. Sin embargo, los niveles de adrenalina y noradrenalina fueron consistentemente indetectables. Para explicar la ausencia de estos últimos productos de la ruta de síntesis de catecolaminas, se analizó la expresión de la enzima *Dbh* (responsable de la conversión de dopamina a noradrenalina, Fig. 2 y Fig. 15A) por HIS en embriones de st 12. No se obtuvo señal específica mediante HIS, probablemente por expresarse por debajo del límite de detección de la técnica. Sin embargo, fue posible detectar la expresión de *Dbh* mediante RT-qPCR (Fig. 15D). Los niveles de mRNA de la *Dbh* fueron mucho menores que los encontrados para el mRNA de la *Th*, aproximadamente unas 9, 80 y 190 veces menos en st 5, st 8 y st 10, respectivamente (Fig. 15E). Estas diferencias eran incluso mayores (de 12 a 900 veces menos) en la región cardíaca correspondiente de esos mismos estadios. Estos resultados sugieren que la ausencia de noradrenalina y adrenalina es debida a la baja expresión de la enzima *Dbh*, y que las principales catecolaminas presentes en el embrión previamente a la diferenciación neuronal y adrenal son la dopamina (en pequeñas cantidades) y su precursor, la L-DOPA.

Con estos resultados podemos afirmar que la *Th* se expresa siguiendo un patrón dinámico a lo largo de las primeras etapas de la cardiogénesis, y que además se encuentra funcionalmente activa. Estas evidencias llevaron a considerar que la TH podría tener un papel en la formación del corazón.

6.1.1. Expresión de la *Th* en el proepicardio.

Continuando con el estudio de la expresión de la *Th* en estadios posteriores de desarrollo, observamos que la *Th* se expresa en otro tejido que contribuye a la formación del corazón, el proepicardio. El análisis más detallado de la expresión de la *Th* en st 12 reveló un marcaje más intenso en el asta derecha del polo posterior del tubo cardíaco, lugar donde aparecen los precursores del proepicardio (Fig. 9; Fig. 16). Posteriormente, la expresión de la *Th* se localizó en el proepicardio ya formado (Fig. 16). Secciones transversales muestran que la expresión de la *Th* es generalizada en esta estructura, puesto que aparece en la población epitelial y mesenquimal del proepicardio. Estos resultados sugieren un posible papel de esta enzima en la formación y desarrollo del órgano proepicardial, aspecto que se continuará investigando por otros miembros del grupo.

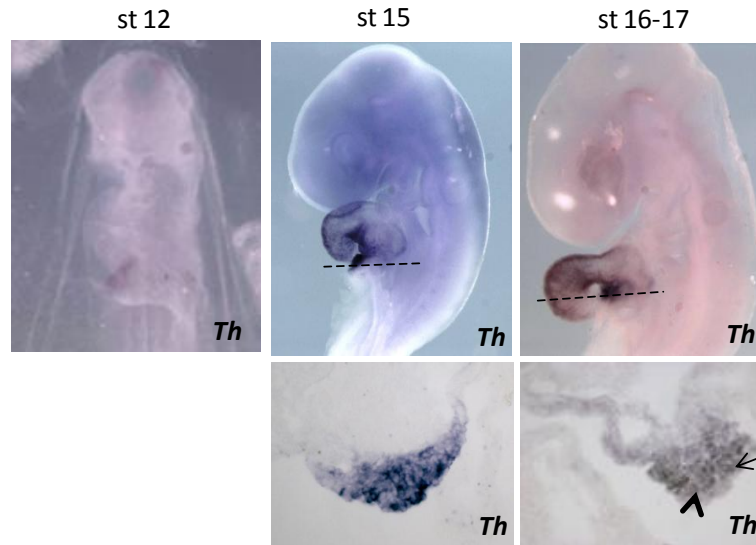


Figura 16. HIS para *Th* en embrión completo de pollo de st 12, st 15 y st 16-17. En los paneles inferiores, secciones de criostato transversales al nivel que se indica con la línea de puntos. Como se aprecia en las secciones, la *Th* se detecta en los componentes epiteliales (flecha) y mesenquimales (punta de flecha) del proepicardio. En este caso, la señal para *Th* en el tubo cardíaco de st 12 es más débil ya que el revelado se detuvo antes para alcanzar la señal óptima el polo posterior del tubo. (*Experimento realizado en colaboración con la Dra. Esther Hernández*).

6.2. Inducción de genes cardíacos por implantación de microesferas de dopamina.

En estudios previos de nuestro grupo se había demostrado que la dopamina inducía la expresión ectópica de factores de transcripción cardíacos, como *Nkx2.5* o *Tbx5*, y de la miosina auricular *Amhc-1* (Figura 17; López-Sánchez *et al*, 2010).

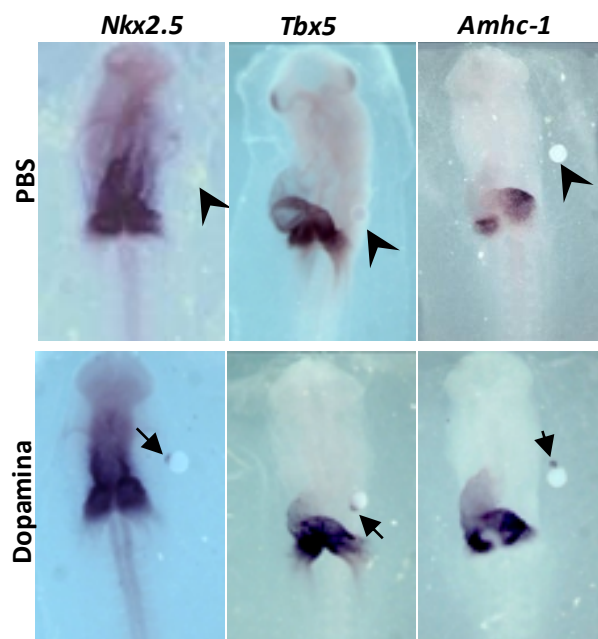


Figura 17. Efecto de la dopamina en la expresión de los genes cardíacos. La microesfera implantada fue tratada con PBS (vehículo) o una solución de 10 μ M de dopamina. Cuando los embriones alcanzaron el st 10-12, se realizó una HIS para *Nkx2.5*, *Tbx5* y *Amhc-1*. El tejido ectópico adyacente a la microesfera impregnada con dopamina expresaba los marcadores analizados. (*Resumen de datos previos a la elaboración de esta Tesis Doctoral*).

Continuando con estos estudios, en esta Tesis Doctoral se ha analizado la interacción de la dopamina con moléculas inductoras de cardiogénesis como BMP-2. Esta proteína es uno de los primeros factores que inducen la diferenciación del mesodermo precardiaco, actuando a través del complejo kinasa activada por TGF- β (TAK ; del inglés *TGF β -activated kinase*)/proteína de unión a TAK (TAB; del inglés *TAK binding protein*), el factor de activación de la transcripción 2 (ATF2; del inglés *activating transcription factor 2*) y SMAD (del inglés *small mothers against decapentaplegic*) (Monzen *et al*, 1999 y 2001; Brand *et al*, 2003).

Para ello, se implantaron microesferas de heparina impregnadas en dopamina en posición lateral o medial en uno de los campos cardíacos bilaterales del embrión en st 5 (Fig. 18). Como control, se utilizaron microesferas impregnadas en PBS. Tras la implantación, los embriones se continuaron incubando hasta st 8 y st 10, que corresponden a las etapas de formación de los tubos endocárdicos y del tubo cardíaco, respectivamente. En estos embriones se analizó mediante HIS la expresión de *Bmp-2*. Como se muestra en la Figura 18B, la dopamina aumentó la expresión de *Bmp-2* en el tubo endocárdico ipsilateral a la microesfera en el embrión de st 8, mientras que la microesfera control no tuvo ningún efecto (Fig. 18A). En estadios posteriores se observó que la dopamina indujo la expresión ectópica de *Bmp-2*, no observándose ese efecto con la microesfera control (Fig. 18C y D).

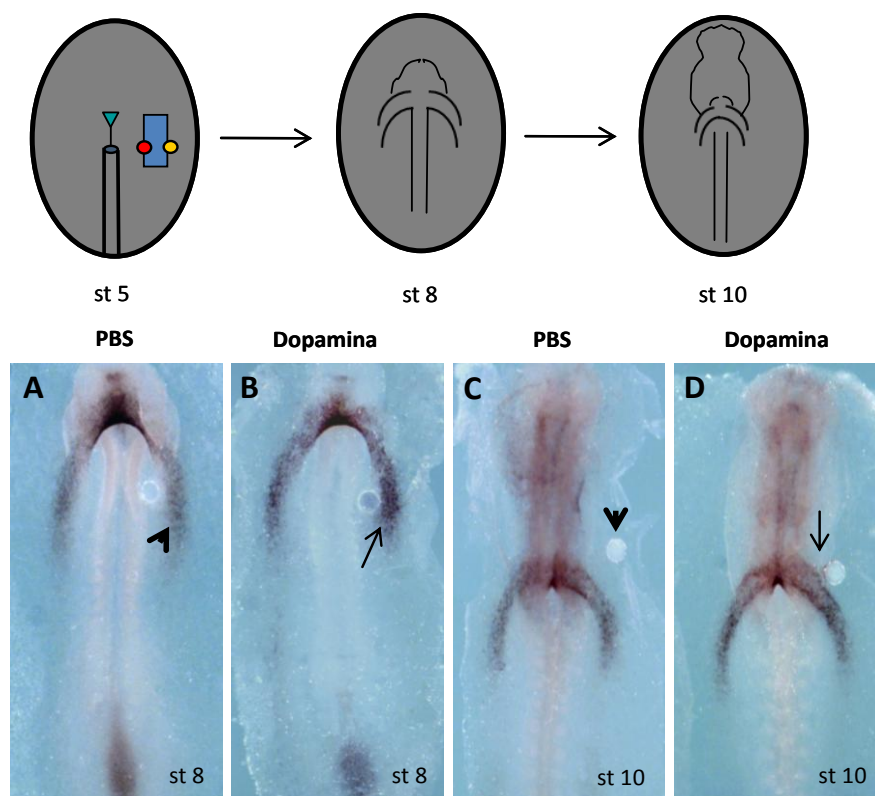


Figura 18. Efecto de la dopamina en la expresión de *Bmp-2*. El esquema corresponde a un embrión de st 5 con una microesfera implantada lateral (círculo amarillo) o medial (círculo rojo) a uno de los campos cardíacos bilaterales (rectángulo azul). Las microesferas fueron tratadas con PBS (vehículo) o una solución de 10 μ M de dopamina. La expresión de *Bmp-2* se analizó mediante HIS en embriones de st 8 (A-B) o st 10 (C-D). La flecha señala la inducción de *Bmp-2* por la microesfera impregnada con dopamina y la punta de flecha la ausencia de inducción por la microesfera control.

Estos resultados sugieren que la *Th* interviene en programas tempranos de diferenciación cardíaca.

6.3. Análisis del efecto de la sobreexpresión de la *Th* en la región precardiogénica del embrión de pollo.

Estudios genéticos de ganancia de función habían mostrado mediante HIS que la sobreexpresión de la *Th* en el tubo cardíaco primitivo expandía la expresión de *Amhc-1* y *Tbx5* hacia regiones más rostrales (Fig. 19; López-Sánchez *et al*, 2010).

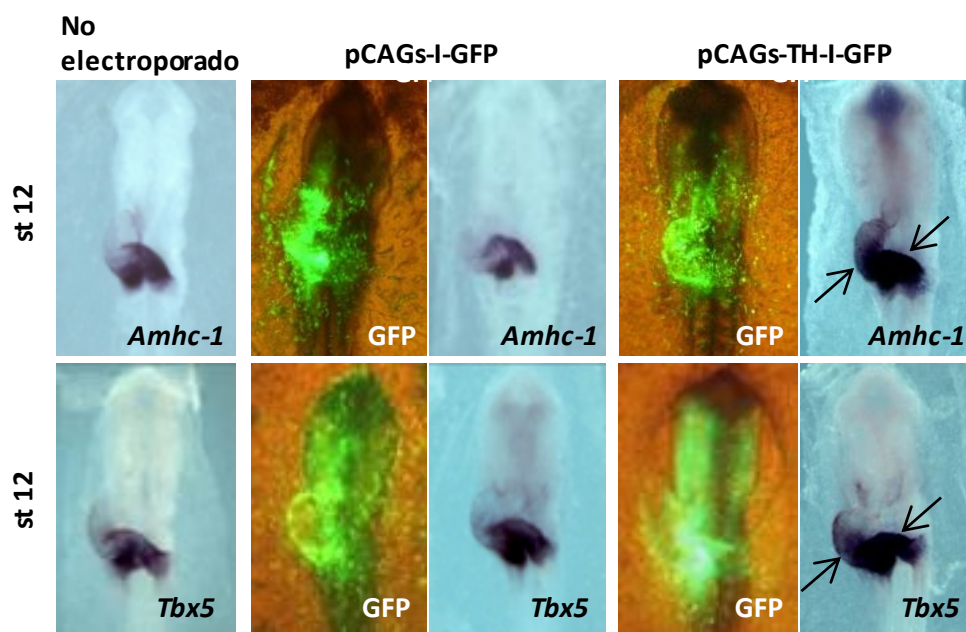


Figura 19. Efecto de la ganancia de función de la *Th* en la expresión de genes de la región posterior del tubo cardíaco. HIS para *Amhc-1* y *Tbx5* en embriones no electroporados, o electroporados con la construcción control (pCAGs-I-GFP) o con la construcción que sobreexpresa *Th* (pCAGs-TH-I-GFP). La expansión de la expresión de *Amhc-1* y *Tbx5* se indica con las flechas. Se muestra también la visualización de la GFP tras la electroporación. (Resumen de datos previos a la elaboración de esta Tesis Doctoral).

Como la HIS es una técnica principalmente cualitativa, en esta Tesis complementamos estos estudios mediante una técnica más cuantitativa como es la RT-qPCR. Embriones en st 3 se electroporaron con un constructo bicistrónico conteniendo el cDNA de la *Th* de pollo y el cDNA de la *Gfp* (pCAGs-TH-I-GFP) en las células progenitoras cardíacas en migración a través de la línea primitiva. Como control, se usó un vector que contenía únicamente el cDNA de la *Gfp* (pCAGs-I-GFP). Para valorar de manera cuantitativa el efecto de la sobreexpresión de la *Th*, los embriones se dejaron progresar hasta st 12. Tras comprobar la electroporación de los embriones mediante la detección de fluorescencia en la región cardíaca, se diseccionaron los corazones embrionarios y se dividieron en tres sectores: sector anterior (comprende el tracto de salida), sector anteromedial (comprende los futuros ventrículos) sector posterior (comprende las futuras aurículas) (Fig. 20, esquema). Mediante RT-qPCR se analizó la

expresión de genes con restricción posterior (*Amhc-1* y *Tbx5*) en la región anteromedial del tubo cardíaco.

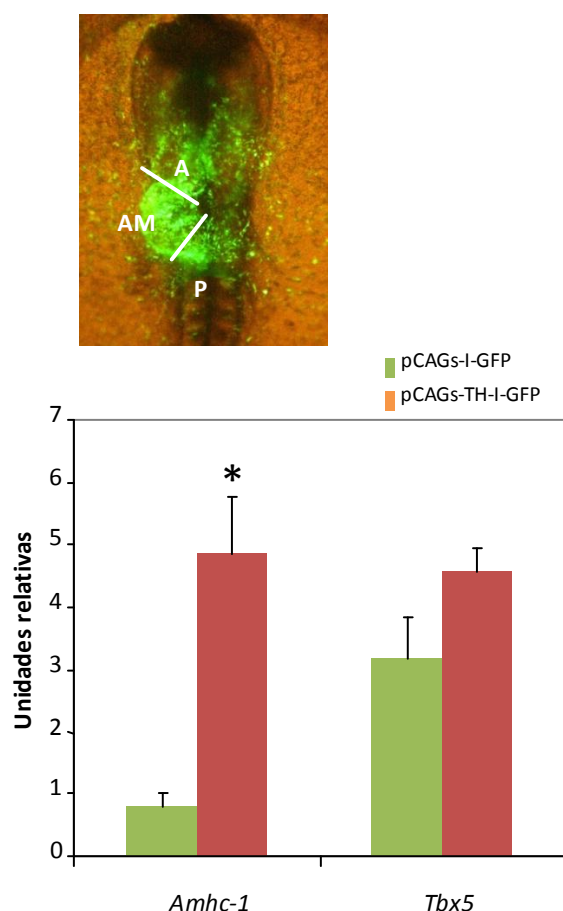


Figura 20. Efecto de la sobreexpresión de la *Th* en la expresión de *Amhc-1* y *Tbx5* en la región anteromedial del tubo cardíaco. RT-qPCR de RNA de la región anteromedial del tubo cardíaco de embriones de st 12 electroporados con el plásmido control (pCAGs-I-GFP) o con el que sobreexpresa *Th* (pCAGs-TH-I-GFP). Los niveles de mRNA de *Amhc-1* y *Tbx5* fueron relativizados respecto a los niveles de mRNA de la GAPDH. Los resultados representan la media \pm error estándar de la media (EEM) de 3 grupos de 4 regiones anteromediales. A: sección anterior; AM: sección anteromedial; P: sección posterior.

Como se muestra en la Figura 20, la sobreexpresión de *Th* aumentó 5 veces los niveles de mRNA de *Amhc-1* en la región anteromedial, respecto a los niveles encontrados en las muestras control. Se observó también un incremento más modesto (estadísticamente no significativo) de *Tbx5*. Estos resultados coinciden con las observaciones realizadas por nuestro grupo mediante HIS, donde la expresión localizada de *Amhc-1* y *Tbx5* en la región posterior se expandía hacia la región anterior del tubo cardíaco en condiciones de sobreexpresión de *Th*.

La sobreexpresión de *Th* también tuvo importantes consecuencias funcionales, ya que los embriones electroporados con pCAGs-TH-I-GFP mostraron bradiarritmia. Los embriones fueron grabados en “time lapse video” y se cuantificó la frecuencia cardíaca. Mientras que los embriones de st 11 electroporados con el vector control (pCAGs-I-GFP) presentaban una frecuencia cardíaca de 100 lpm (latidos por minuto), la de los que sobreexpresaban *Th* era de 53 lpm (Tabla 3). Además, los embriones electroporados con *Th* mostraron latidos asincrónicos (ver película en el CD anexo; López Sánchez *et al*, 2010).

	No electroporado (n=10)	pCAGs-I-GFP (n=10)	pCAGs-TH-I-GFP (n=10)
LPM	100.6 ± 3.53	100.5 ± 3.02	53.1 ± 2.68

Tabla 3. Efecto de la sobreexpresión de la *Th* en la frecuencia cardíaca
LPM: latidos por minuto. Los resultados representan la media ± SD

6.4. Implicación de la TH en la ruta del ácido retinoico.

6.4.1. Implantación de microesferas impregnadas en ácido retinoico.

Para situar la acción de la TH en el contexto de otras rutas conocidas determinantes del patrón anteroposterior del tubo cardíaco primitivo, analizamos la posible relación de la TH con el AR. En vertebrados, una de las vías que establece la identidad anteroposterior del tubo cardíaco es la del AR, la cual confiere identidad posterior (Mendelson *et al* 1994; Yutzey *et al*, 1994; Liberatore *et al*, 2000; Hochgreb *et al* 2003; Xavier-Neto *et al*, 2001; Sirbu *et al*, 2008). Este hecho, junto a la acción que se describe aquí de la TH y que la expresión de la *Th* en el sistema nervioso y la glándula adrenal está regulada por el AR (Jeong *et al* 2006; Gelain *et al*, 2007), nos llevó a postular que la expresión de la TH podría ser regulada por la actividad del AR.

Para probar esta hipótesis, se implantaron microesferas de AG1-X2 impregnadas en AR (10 µg/ml) en uno de los campos cardíacos bilaterales del embrión de st 5. Como control, se implantaron microesferas impregnadas en DMSO (vehículo). Los embriones se recogieron en st 11 y se analizó la expresión de *Th*, *Amhc-1* y *Tbx5* mediante HIS. Como se muestra en la Figura 21, el AR expandió la expresión de la *Th* en el tracto de entrada ipsilateral a la microesfera y también rostralmente. Un efecto semejante, aunque más potente, se observó en la expresión de *Amhc-1* y *Tbx5* (Fig. 21).

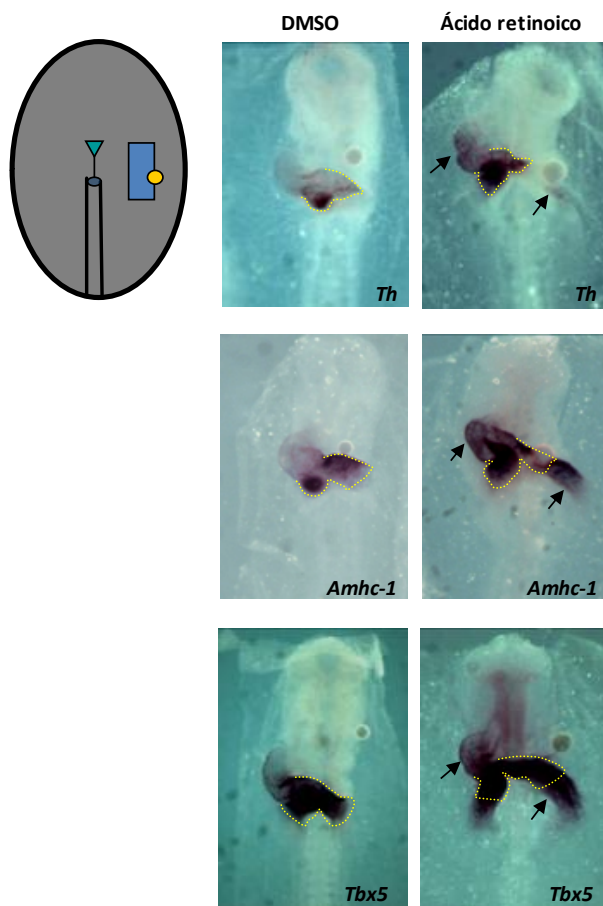


Figura 21. Efecto del ácido retinoico en la expresión de la *Th*, *Amhc-1* y *Tbx5*. Microesferas (círculo amarillo del esquema) impregnadas en DMSO (vehículo) o AR se implantaron lateralmente a uno de los campos cardíacos bilaterales (rectángulo azul). La expresión de *Th*, *Amhc-1* y *Tbx5* se analizó en st 12. Se observó una expansión de la expresión de los genes analizados en el tubo cardíaco y en el tracto de entrada (se marca el dominio normal de expresión mediante la línea amarilla discontinua).

6.4.2. Inhibición de la ruta de síntesis de ácido retinoico a través de la administración de citral.

Para confirmar que la expresión de la *Th* se encuentra bajo el control del AR, analizamos el efecto de la inhibición de la síntesis de éste último. Para ello, se administró citral (1 mM y 10 mM), un inhibidor de la retinaldehído deshidrogenasa (Kikonyogo *et al*, 1999), en forma de ducha sobre la región precardiogénica de embriones de st 5. Los embriones control fueron tratados con el vehículo, en este caso, 1 % etanol en PBS.

Tras 12-18 h de incubación, se analizaron los embriones en st 10-11. La inhibición de la señalización del AR resultó en alteraciones macroscópicas en la morfogénesis del tubo cardíaco (Fig. 22), como había sido descrito anteriormente (Hoechgreb *et al*, 2003). Además, la expresión de la *Th* disminuyó dramáticamente de forma dosis-dependiente (Fig. 22). Paralelamente, se observó un descenso en la expresión de la miosina auricular *Amhc-1* y de *Tbx5*.

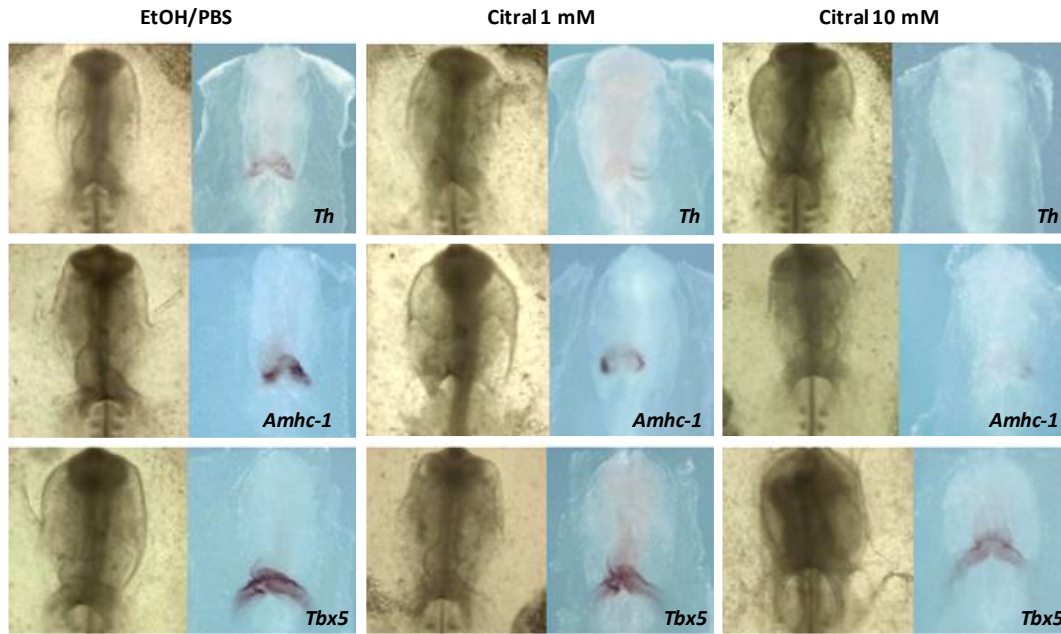


Figura 22. Efecto de la inhibición de la síntesis del ácido retinoico. Embriones en st. 5 fueron tratados con citral (1 mM ó 10 mM) o con 1% etanol en PBS (vehículo). En st. 10-11 se analizó la expresión de *Th*, *Amhc-1* y *Tbx5* por HIS. La adición de citral inhibe la expresión de *Th*, *Amhc-1* y *Tbx5* de manera dependiente de la dosis.

6.5. Expresión de los receptores dopaminérgicos en la región cardíaca del embrión de pollo.

Con objeto de analizar qué tipo de receptor podría estar mediando la acción temprana de la dopamina en los estadios embrionarios de formación del tubo cardíaco, se realizó una RT-qPCR para los receptores dopaminérgicos de pollo en el tubo cardíaco de embriones de st 10 y st 12.

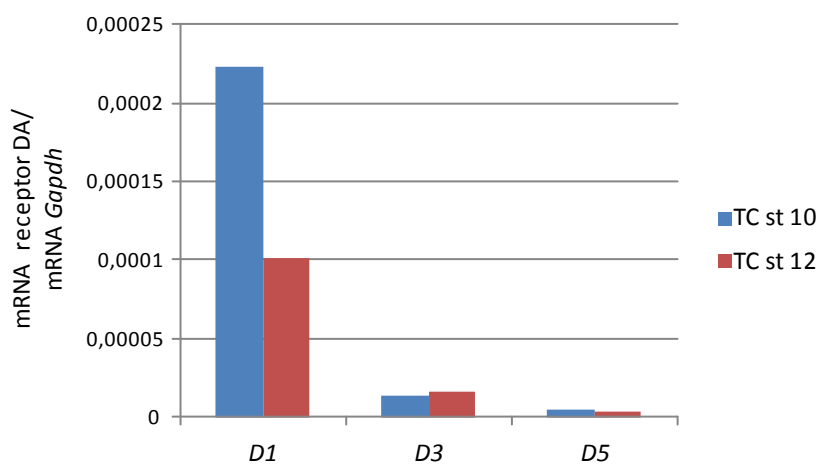


Figura 23. RT-qPCR para los receptores dopaminérgicos *D1*, *D3* y *D5* en el tubo cardíaco del embrión de pollo de st 10 y st 12. TC: tubo cardíaco.

Se detectó la expresión de receptores de las familias *D1* (*D1* y *D5*) y *D2* (*D3*), siendo más abundantes los de tipo *D1* (Fig. 23). No se detectó expresión de los receptores *D2* ni *D4* (pertenecientes a la familia *D2*). La expresión de estos receptores permite la señalización intracelular de la dopamina, aunque sería necesario hacer tratamientos con agonistas y antagonistas específicos para confirmar qué tipo de receptor está involucrado en cada estadio. Probablemente esta caracterización sea más factible en sistemas de cultivos celulares que en el embrión completo.

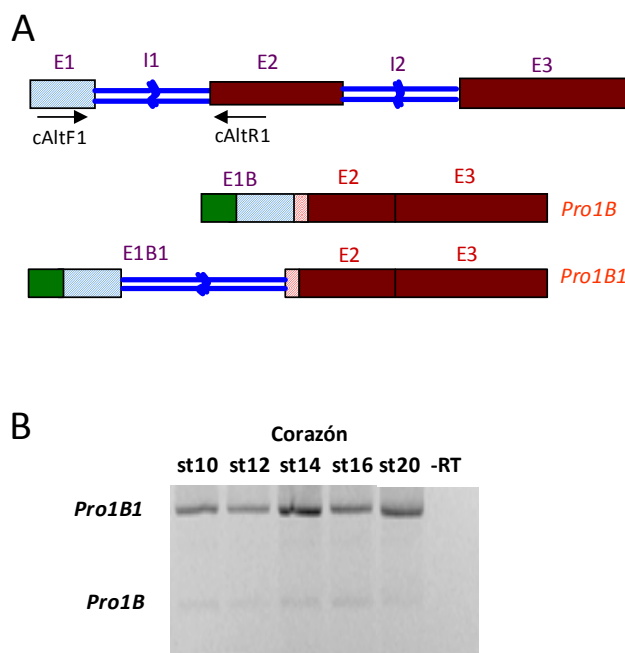
6.6. Análisis de la expresión de la proinsulina en el embrión de pollo durante el desarrollo cardíaco.

El segundo aspecto que hemos abordado en esta Tesis es el estudio de la expresión y función de la proinsulina en el desarrollo cardíaco.

En estudios previos de nuestro grupo se había descrito la presencia de dos transcritos embrionarios de proinsulina que difieren del transcrito pancreático en su 5' UTR. En primer lugar, el transcrito embrionario *Pro1B*, que tiene una extensión de 32 nucleótidos en su extremo 5' UTR respecto al transcrito pancreático (*Pro1A*) (Hernández-Sánchez *et al*, 2003). En segundo lugar, el transcrito *Pro1B1*, que es una variante alternativa de procesamiento del transcrito *Pro1B* ya que retiene el intrón 1 en la región 5' UTR (Mansilla *et al*, 2005) (Fig. 24A). El transcrito *Pro1B* produce niveles de proinsulina más bajos que el transcrito pancreático, mientras que el transcrito *Pro1B1* tiene prácticamente bloqueada su traducción. Los transcritos embrionarios *Pro1B* y *Pro1B1* presentan regulación alternativa durante las primeras etapas del desarrollo cardíaco. Así, en st 4, la región precardiaca expresa mayoritariamente la isoforma con intrón procesado (*Pro1B*). Conforme avanza el desarrollo cardíaco, la retención del intrón aumenta, siendo la isoforma *Pro1B1* la más abundante en el tubo cardíaco de st 10 (Mansilla *et al*, 2005).

En esta Tesis Doctoral se ha continuado el análisis del patrón de procesamiento cardíaco de la proinsulina embrionaria en estadios posteriores. Utilizando cebadores en el exón 1 y 2 de la proinsulina (cAltF1 y cAltR1; Fig. 24A) podemos amplificar en la misma reacción de PCR el transcrito embrionario totalmente procesado (*Pro1B*) y el que retiene el intrón 1 (*Pro1B1*), y así analizar la abundancia relativa de ambas isoformas.

Figura 24. Expresión de la proinsulina en el desarrollo cardíaco del embrión de pollo. A. Esquema de la organización exónica del gen de la proinsulina de pollo y sus transcritos embrionarios *Pro1B* y *Pro1B1*: exones (E1, en rectángulo azul claro; E2 y E3, en rectángulo rojo), intrones (I, en líneas azul oscuro) y cebadores (cAltF1 y cAltR1) utilizados en la PCR. La región 5'UTR extendida del exón 1 en las isoformas *Pro1B* y *Pro1B1* se marca con un rectángulo verde. B. RT-PCR de RNA de tubo cardíaco o corazón de embriones de pollo de los estadios indicados con los cebadores cAltF1 y cAltR1 (diagrama en A). Se incluyó un control (-RT) sin cDNA de ausencia de contaminación con DNA genómico.



Como se había descrito en estudios previos (Mansilla *et al*, 2005) la isoforma mayoritaria en el tubo cardíaco de st 10 era la que retiene el intrón 1, y este patrón se mantuvo hasta st 20 (el más avanzado que fue analizado) (Fig. 24B).

Para estudiar la distribución del mRNA de la proinsulina, se realizó una HIS en embrión completo de pollo en st 7-8 hasta st 20, utilizando una sonda contra la región codificante común para los transcritos *Pro1B* y *Pro1B1*. Desafortunadamente, no se detectó señal específica. Sin embargo, sí se observó señal específica en el páncreas de embrión de pollo de E14, y en embriones electroporados con un vector que sobreexpresa proinsulina (pCAGs-I-Pro1A-GFP) (ver más adelante Fig. 27), indicando que la ausencia de señal específica probablemente sea debida a los bajos niveles de expresión de proinsulina en esos estadios y no a problemas técnicos con la sonda.

Dado que la técnica de RT-qPCR es bastante más sensible que la HIS, además de ser cuantitativa, decidimos caracterizar el patrón temporal de expresión de la proinsulina mediante esta técnica. Primero, estudiamos los niveles totales del mRNA de proinsulina a lo largo de varias etapas del desarrollo comparando la expresión en la región precardiogénica respecto a la del embrión total. Como se muestra en la Fig. 25A, la expresión de proinsulina en el embrión completo aumentó entre st 5 y st 8, y disminuyó entre st 8 y st 10. Este mismo patrón de expresión se observó en las regiones cardíacas de los estadios correspondientes. Un aspecto a resaltar es que, en los tres estadios de desarrollo analizados, la expresión de proinsulina está enriquecida en la región cardíaca (Fig. 25A).

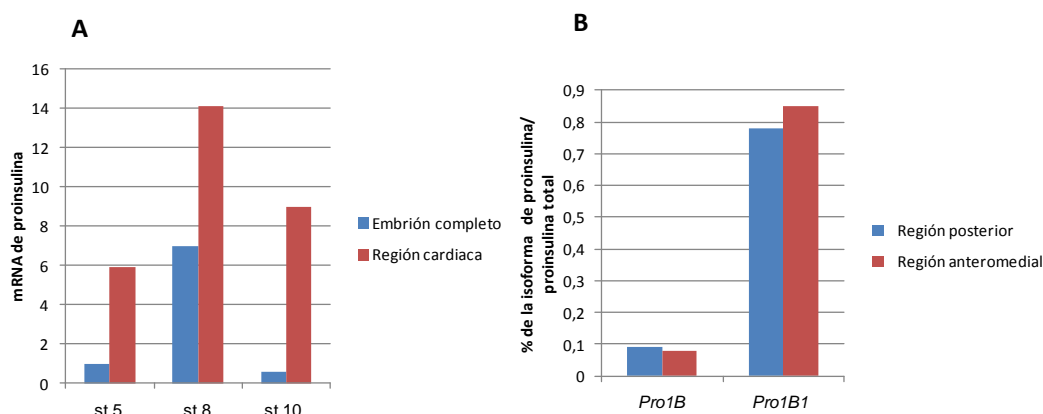


Figura 25. Expresión de la proinsulina en el desarrollo cardíaco del embrión de pollo. A- RT-qPCR de proinsulina total en embrión completo y en la región cardíaca de embriones de st 5-st 10. B- RT-qPCR de la expresión de las isoformas de proinsulina (*Pro1B* y *Pro1B1*) en la región posterior (futuras aurículas) y anteromedial (futuros ventrículos) del tubo cardíaco del embrión de st 12.

Uno de los primeros eventos en la morfogénesis del corazón es el establecimiento de la polaridad anteroposterior del tubo cardíaco y, entre las primeras evidencias de este proceso, se encuentra la restricción de la expresión de algunos genes a la región anterior o posterior del tubo cardíaco (apartado 3.4.3 de la Introducción y 6.3-6.4 de Resultados). Por tanto, decidimos analizar el patrón de procesamiento de la proinsulina en las regiones anterior y posterior del tubo cardíaco de st 12. Para ello, el tubo cardíaco se dividió en tres sectores (Fig. 20): sector anterior (comprende el tracto de salida), sector anteromedial (comprende los futuros ventrículos) y sector posterior (comprende las futuras aurículas). La expresión de los transcritos embrionarios de proinsulina se analizó en el sector anteromedial y en el sector posterior. Como se muestra en la Figura 25B, el transcrito mayoritario en ambos sectores es el que retiene el intrón 1 (*Pro1B1*), no observándose un procesamiento diferencial del intrón 1 entre la región anterior y posterior del tubo cardíaco de st 12.

En conjunto, estos resultados indican que en estadios muy tempranos de la cardiogénesis (st 5) se expresa el transcrito de proinsulina que produce bajos pero significativos niveles de proinsulina (*Pro1B*). Según avanza el desarrollo, aumenta la proporción del transcrito que retiene el intrón 1, que prácticamente no produce proinsulina (*Pro1B1*), siendo la forma predominante a partir de la formación del tubo cardíaco (st 10). Estos resultados sugieren que los niveles de proinsulina están estrictamente regulados a la baja durante las primeras etapas del desarrollo cardíaco.

6.7. Análisis del efecto de la sobreexpresión de proinsulina en la región precardiogénica del embrión de pollo.

Para analizar la relevancia fisiológica de la regulación de los niveles de proinsulina en las primeras etapas del desarrollo cardíaco, se realizaron estudios de ganancia de función electroporando construcciones que generan diferente cantidad de proinsulina. Inicialmente,

nos planteamos comparar el efecto de la sobreexpresión de los transcritos embrionarios *Pro1B* y *Pro1B1*. Sin embargo, no fue posible ya que el intrón 1 de la construcción *Pro1B1* electroporada se procesaba espontáneamente en el embrión, aún cuando el transcrito endógeno mayoritario era el que retenía el intrón 1. Los embriones fueron electroporados en st 3-4 en la línea primitiva y analizados en st 11-12. Se recogió la zona caudal de embriones semejantes electroporados con la construcción pCAGs-*Pro1B1*-I-GFP o el plásmido control (Fig. 26A), y se procedió a la extracción de RNA. Se analizó la expresión de los transcritos *Pro1B* y *Pro1B1* mediante RT-PCR con los cebadores cAltF1 y cAltR1 descritos en la Fig. 24A.

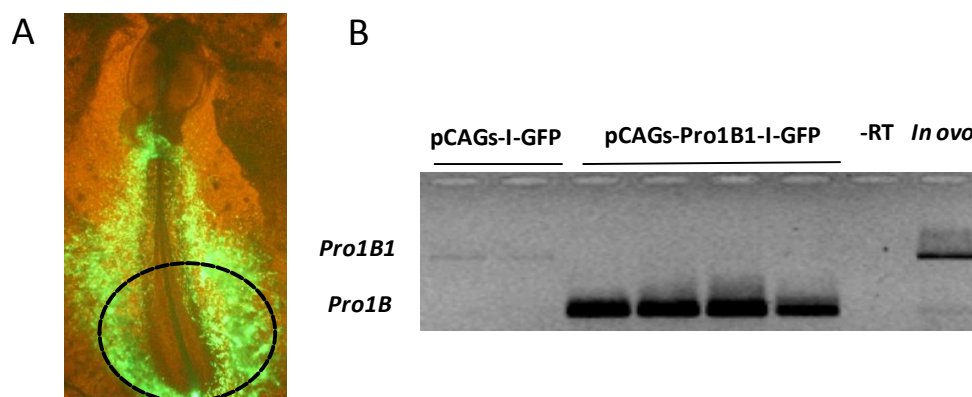


Figura 26. Procesamiento del intrón 1 de la proinsulina tras la electroporación de la construcción conteniendo el cDNA del transcrito *Pro1B1*. A. Embrión de st 11-12 con la región caudal delimitada con la línea de puntos recogida para la extracción de RNA. B. RT-PCR de la región caudal de embriones electroporados con la construcción control (pCAGs-I-GFP), con la construcción conteniendo el cDNA del transcrito *Pro1B1* (pCAGs-*Pro1B1*-I-GFP) o no electroporados (*in ovo*) para los transcritos de proinsulina (*Pro1B* y *Pro1B1*). Como control de la ausencia de contaminación de DNA genómico se incluyó una muestra en la que no se realizó la RT (-RT).

Como se muestra en la Figura 26B, en los embriones electroporados con la construcción pCAGs-*Pro1B1*-I-GFP se detectaron altos niveles del transcrito *Pro1B* mientras que no se detecta expresión del transcrito *Pro1B1*. Por el contrario, tanto en los embriones no electroporados (*in ovo*) como en los electroporados control (pCAGs-I-GFP) del mismo estadio (st 11-12), el transcrito que se detecta principalmente es el que retiene el intrón (*Pro1B1*).

Estos resultados indican que en la construcción electroporada pueden faltar elementos en CIS que regulan la retención del intrón 1, y no puede ser utilizada para el presente estudio.

Por tanto, modificamos nuestra estrategia y comparamos el efecto de la sobreexpresión del transcrito embrionario *Pro1B* (baja producción de proinsulina) y la del transcrito pancreático *Pro1A* (alta producción de proinsulina) (Hernández-Sánchez *et al*, 2003). Los embriones fueron electroporados en st 3-4 en la línea primitiva y analizados en st 11-12. Inicialmente comprobamos que la expresión de GFP coincidía con la del mRNA de proinsulina. Para ello realizamos una HIS con una sonda de proinsulina que comprendía toda la región codificante, común a los diferentes transcritos de proinsulina.

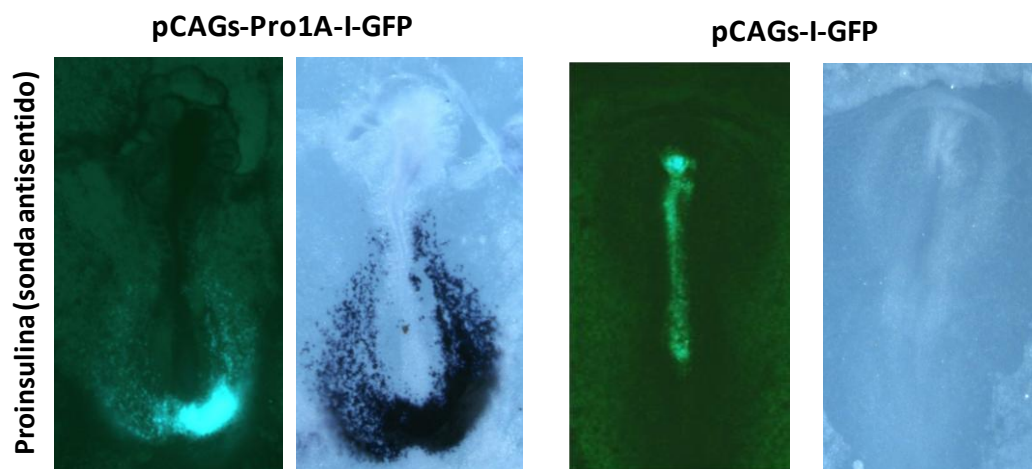


Figura 27. Hibridación *in situ* para proinsulina tras la electroporación con la construcción que sobreexpresa el transcrito pancreático (pCAGs-Pro1A-I-GFP) o con la construcción control (pCAGs-I-GFP).

Como se muestra en la Fig. 27, la expresión de proinsulina detectada por HIS coincidía con la expresión de la GFP en los embriones electroporados con la construcción pCAGs-Pro1A-I-GFP, que sobreexpresa el transcrito de proinsulina pancreática *Pro1A*, mientras que en los embriones electroporados control (pCAGs-I-GFP) no se detectó señal específica. Como se comentó anteriormente, los niveles endógenos de proinsulina quedan por debajo del límite de detección de la HIS. Para comprobar que además de producirse mRNA de proinsulina a partir de la construcción electroporada había producción de proteína, se electroporó una construcción en la que el cDNA de la proinsulina estaba fusionado al epítipo V5 (Hernández-Sánchez, 2003). Este epítipo facilita la detección de proinsulina ya que no disponíamos de anticuerpos contra la proinsulina de pollo. En los extractos de embriones electroporados con la construcción pCAGs-Pro1AV5-I-GFP se detectó una banda del tamaño de la proinsulina más el epítipo V5. No se detectó expresión proteica en los embriones electroporados con la construcción control (pCAGs-I-GFP) ni en los no electroporados (*in ovo*), confirmando así la especificidad de la banda (Fig. 28). Como control de la eficiencia de electroporación se analizó la expresión de GFP, y como control de carga la expresión de β -actina.

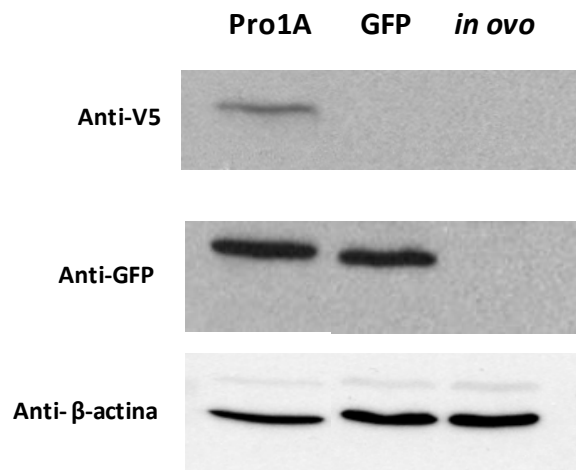


Figura 28. Análisis de la traducción del transcrito de proinsulina *Pro1A* tras la electroporación. Se recogieron grupos de 3 embriones de st 11-12 electroporados con construcciones pCAGs-Pro1AV5-I-GFP y pCAGs-I-GFP con una señal similar de expresión de GFP o embriones sin electroporar (*in ovo*). Los extractos proteicos de los diferentes grupos de embriones se sometieron a análisis por *Western blot* mediante la incubación sucesiva con los anticuerpos: anti-V5 para la detección de proinsulina-V5, anti-GFP y anti β-actina.

Seguidamente, analizamos el efecto de la sobreexpresión de proinsulina. Para ello, se electroporaron embriones en st 3-4 en la población celular en migración a través de la línea primitiva que va a formar parte del corazón con las construcciones que sobreexpresan la isoforma pancreática (*Pro1A*) o la embrionaria (*Pro1B*). El análisis morfológico inicial mostró una alta frecuencia de anomalías en el tubo cardíaco de los embriones que sobreexpresaban estos transcritos, *Pro1A* y *Pro1B*, siendo éstas más graves y prevalentes en los que sobreexpresaban el transcrito *Pro1A* (Fig. 29 y Tabla 4).

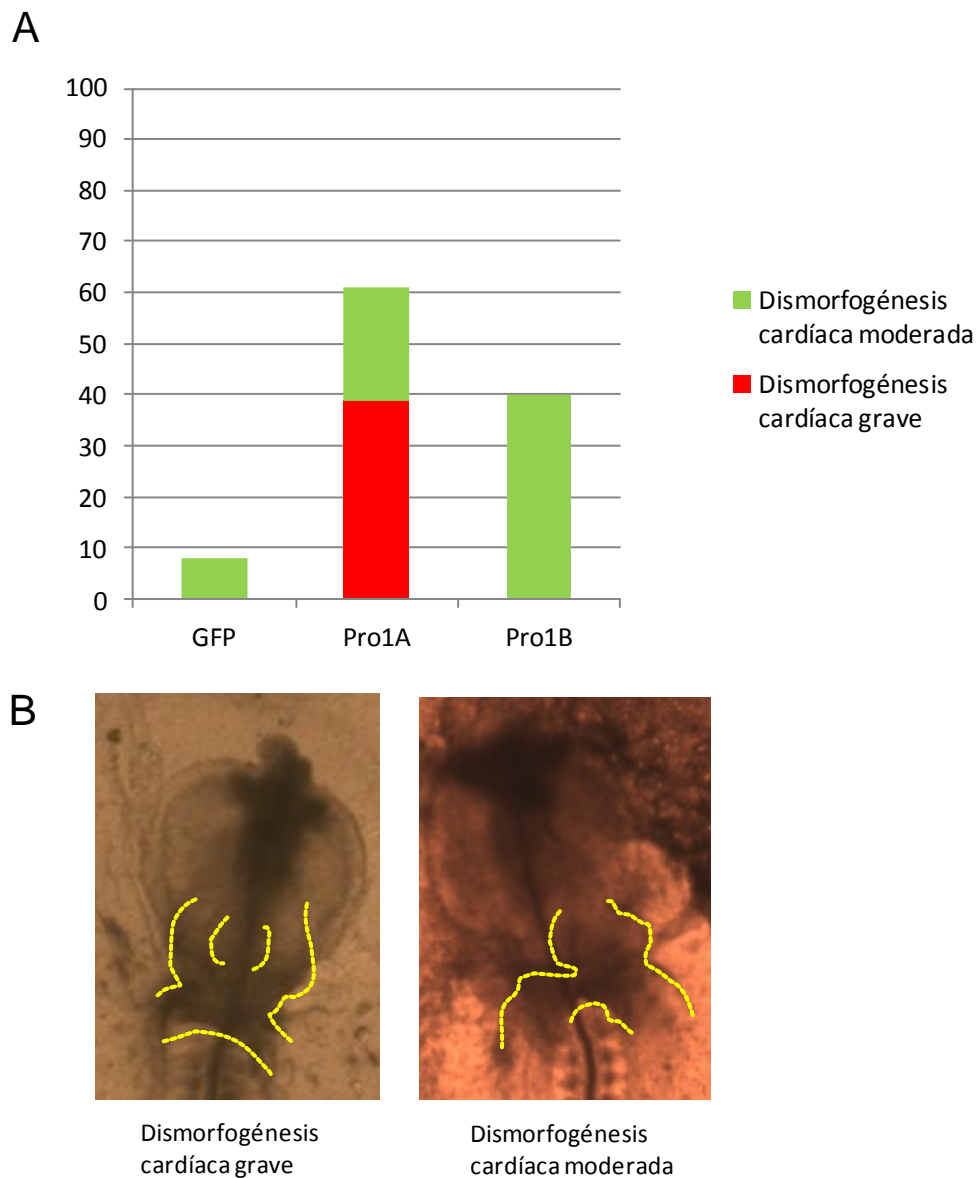


Figura 29. Análisis del efecto de la sobreexpresión de proinsulina en la región precardiogénica del embrión de pollo. A. El fenotipo cardíaco se analizó en st 11-12 tras la electroporación de la zona precardiogénica con las construcciones que expresan el transcrito pancreático (pCAGs-Pro1A-I-GFP) o el transcrito embrionario (pCAGs-Pro1B-I-GFP). Como control, se incluyeron embriones electroporados con la construcción que sólo expresa GFP. B. Malformaciones cardíacas más comunes observadas tras la electroporación.

Las anomalías en la morfología del tubo cardíaco se clasificaron en dos categorías: dismorfogénesis cardíaca grave y dismorfogénesis cardíaca moderada. La dismorfogénesis cardíaca grave se corresponde con casos en los que el tubo cardíaco no ha llegado a formarse, manteniéndose la región cardíaca como tubos endocárdicos no fusionados o mostrando una morfología aberrante y no funcional. Por otro lado, la dismorfogénesis cardíaca moderada incluye a embriones en los que el tubo cardíaco era capaz de latir y se encontraba definido, aunque presentaba alteraciones morfológicas notables o aspecto globular.

La sobreexpresión del transcrito pancreático (*Pro1A*) dio lugar a que más de un tercio de los embriones (38,9%) no llegaran a formar el tubo cardíaco. Entre los que sí lo formaban, en muchos casos (22,2%) no se llegaba a producir la torsión y el tubo cardíaco presentaba un aspecto globular con un crecimiento anormal de la región medial y anterior del tubo (Tabla 4).

	GFP	Pro1A	Pro1B
Dismorfogénesis cardíaca grave	0/62	14/36 (38,9%)	0/20
Dismorfogénesis cardíaca moderada	5/62 (8,1 %)	8/36 (22,2%)	8/20 (40%)
Desarrollo cardíaco alterado	5/62 (8,1%)	22/36 (61,1%)	8/20 (40%)

Tabla 4. Malformaciones observadas en la morfogénesis cardíaca tras la sobreexpresión de los transcritos de proinsulina.

Los embriones que sobreexpresaban el transcrito embrionario (*Pro1B*) presentaban un fenotipo menos severo. Estos embriones conseguían alcanzar el estadio de formación del tubo cardíaco, pero un alto porcentaje (40%) presentaba alteraciones morfológicas moderadas semejantes a las descritas para los embriones que sobreexpresaban en transcrito *Pro1A* (Tabla 4). Estos resultados establecen una correlación entre el grado de severidad de las malformaciones y la expresión de proinsulina.

Es de destacar que la sobreexpresión de proinsulina a partir del transcrito pancreático interfirió con el desarrollo general del embrión, alterando su tamaño, la formación de somitas o del proceso cefálico. Estos resultados están en consonancia con estudios previos en los que un exceso farmacológico de proinsulina es incompatible con la correcta morfogénesis del embrión (de Pablo *et al*, 1985; Hernández-Sánchez *et al*, 2003). Debido al alto grado de malformaciones inducidas por la sobreexpresión del transcrito pancreático *Pro1A*, decidimos continuar nuestros estudios con el transcrito embrionario *Pro1B*.

Dado que entre las malformaciones más comunes de los embriones sobreexpresando el transcrito embrionario (*Pro1B*) estaba el crecimiento anormal del tubo cardíaco (40%), mostrando engrosamientos de la región medial y anterior del tubo, decidimos analizar en estos embriones la expresión de genes con restricción anterior y posterior.

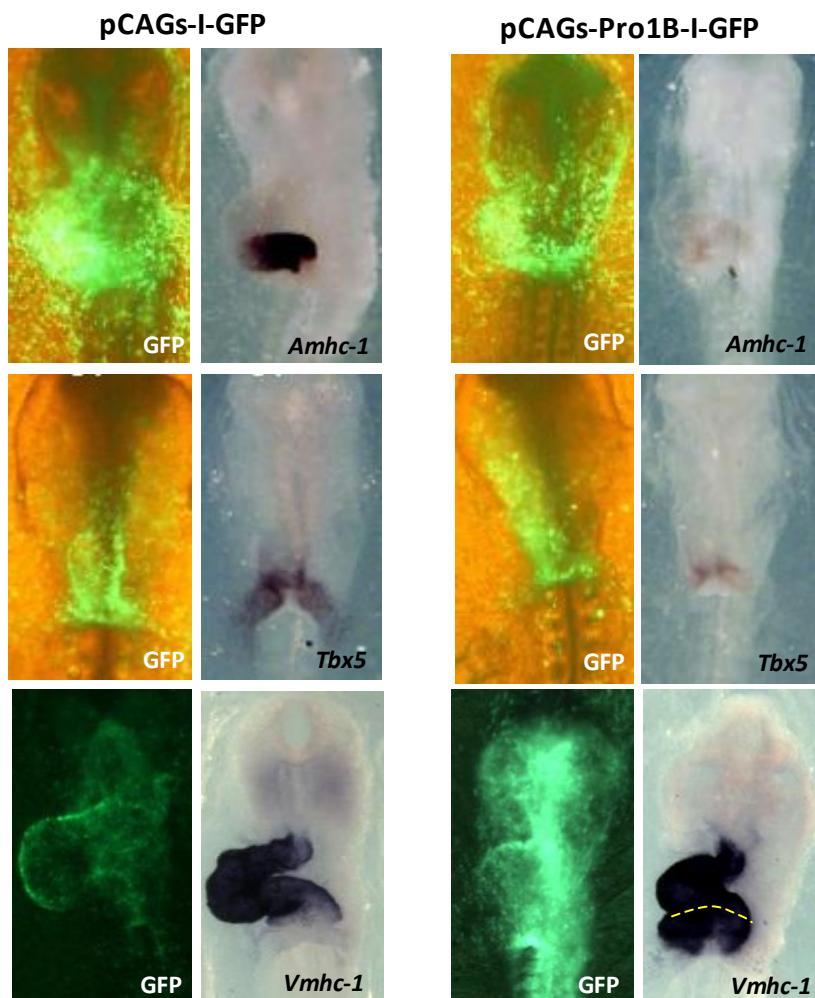


Figura 30. Efecto de la sobreexpresión del transcrito *Pro1B* de proinsulina. HIS para *Amhc-1* y *Tbx5* con expresión en el sector atrial, y *Vmhc-1* con expresión ventricular. Los embriones fueron electroporados con las construcciones indicadas en st 3, y analizados mediante HIS en st 11-12. La línea amarilla discontinua delimita el dominio normal de expresión de *Vmhc-1*.

Mediante HIS se observó una reducción en la expresión de *Amhc-1* y *Tbx5*, genes con restricción posterior, en los embriones que sobreexpresaban el transcrito *Pro1B*, respecto a los embriones electroporados control (Fig. 30). Por el contrario, encontramos un aumento en la expresión de *Vmhc-1*, que en algunos casos extendía su expresión a la región posterior del tubo, invadiendo el tracto de entrada del corazón en formación (Fig. 30).

Estos efectos de la proinsulina son opuestos a los observados por la sobreexpresión de la *Th*, y en conjunto, indican que un exceso de proinsulina interfiere con la correcta morfogénesis del embrión en general y del tubo cardíaco primitivo en particular, siendo necesario un estricto control de su expresión para el desarrollo cardíaco normal.

6.8. Estudio de la expresión de la proinsulina en el desarrollo cardíaco del embrión de ratón.

Tras observar el patrón de expresión de la proinsulina en el embrión de pollo y constatar su implicación en la cardiogénesis temprana, resultó de interés extender de forma preliminar el estudio a otro modelo, el embrión de ratón.

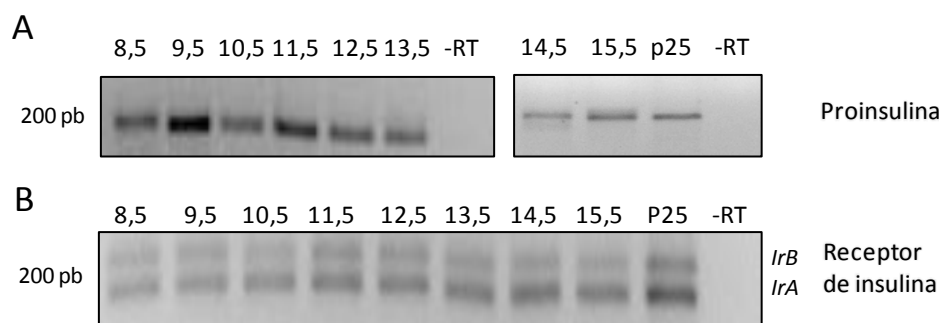


Figura 31. Expresión génica de la proinsulina en el desarrollo cardíaco del embrión de ratón. A. RT-PCR para proinsulina en el corazón del embrión de ratón (E8,5- E15,5). Los cebadores utilizados amplifican tanto el gen de la proinsulina I como el de la proinsulina II. Se incluye también una muestra de corazón de ratón postnatal (P25), y se adjunta un control (-RT) en el que no se añadió cDNA a la reacción de PCR. B. RT-PCR para el receptor de insulina en el corazón del embrión de ratón (E8,5-E15,5 y P25). Los cebadores utilizados amplifican ambas isoformas del receptor (*IrA* y *B*).

Mediante RT-PCR se analizó la expresión del gen de la proinsulina en el corazón embrionario de ratón desde estadio E8,5 hasta E15,5. Este rango cubre desde las primeras etapas de formación del tubo cardíaco hasta la regionalización del mismo en cámaras cardíacas (aurículas, ventrículos y tracto de entrada y de salida). Como se muestra en la Figura 31, se encontró expresión de proinsulina en todas las edades analizadas. De manera similar, se realizó una RT-PCR para el receptor de insulina (Fig. 31B) con cebadores que amplificaban las dos isoformas generadas por procesamiento alternativo del exón 11. Se detectó expresión de ambas isoformas del receptor (*IrA* y *B*) en las diferentes edades embrionarias incluidas en el estudio. Estos resultados preliminares nos indican que la expresión de proinsulina durante la cardiogénesis no está restringida al embrión de pollo, y se halla en otros vertebrados, al menos en el ratón.

7. DISCUSIÓN.

7. DISCUSIÓN

En esta Tesis Doctoral hemos analizado la implicación del *locus* TH-insulina en la cardiogénesis temprana del embrión de pollo. Hemos caracterizado principalmente la función de la TH e iniciado el estudio del papel de la proinsulina. Los resultados presentados aquí indican que la TH/L-DOPA/dopamina está involucrada en la red de señales que dirigen a los precursores cardíacos a la especificación de la región posterior del tubo, concretamente regionalizando la expresión de *Tbx5* y *Amhc-1* a la región posterior del tubo cardíaco primitivo. Por el contrario, la expresión de la proinsulina está silenciada post-transcripcionalmente a partir de la formación del tubo cardíaco y su adición exógena produce una grave dismorfogénesis cardíaca.

7.1. Expresión de la *Th* y actividad de la ruta de síntesis de catecolaminas en el desarrollo cardíaco.

La *Th* se expresa desde etapas muy tempranas. En st 5, el mRNA de la *Th* se encuentra enriquecido en el campo cardíaco del embrión de pollo. En st 8, la expresión se localiza en el mesodermo esplácnico de los tubos endocárdicos y, conforme avanza el proceso de formación del tubo, la expresión génica aumenta y se restringe progresivamente a la región posterior del tubo cardíaco primitivo (Fig. 14 y Fig. 15). Mediante HPLC hemos comprobado la presencia de L-DOPA en todos los estadios analizados desde st 8 (Fig. 15), incrementándose sus niveles conforme avanza el desarrollo. Estos resultados indican que la *Th* se expresa en estadios previos a la diferenciación neural y adrenal, (principales sitios de expresión en organismos postnatales) y además es enzimáticamente activa. De manera ocasional se detectó dopamina en estos mismos estadios. Sin embargo, en ninguno de los estadios analizados se detectó noradrenalina ni adrenalina probablemente debido a los bajos niveles de expresión de la enzima dopamina- β -hidroxilasa (Fig. 15). Por lo tanto, los únicos productos de la ruta de catecolaminas presentes en estas etapas del desarrollo son la L-DOPA (predominante) y la dopamina.

7.2. Implicación de la TH en programas tempranos de diferenciación cardíaca.

La adición de L-DOPA o dopamina exógena provoca la inducción ectópica de tejido cardíaco, caracterizado por la expresión de genes cardíacos como *Amhc-1*, *Tbx5* y *Nkx2.5*, y por la presencia de sarcómeros (Fig. 18; López-Sánchez *et al*, 2010). Por el contrario, el bloqueo de la actividad de TH, y sobre todo, de la producción de dopamina, causa pérdida de expresión de genes cardíacos (López-Sánchez *et al*, 2010). Estos resultados indican que la actividad de la TH es importante durante las etapas iniciales de la especificación de los precursores cardíacos. Aunque no conocemos el mecanismo preciso por el cual la TH modula el reclutamiento o generación de precursores cardíacos, resultados iniciales muestran que la dopamina aplicada de manera exógena aumenta la expresión de *Bmp-2* (Fig. 18) uniendo así la vía de las catecolaminas a la vía cardiogénica de BMP2. La señalización a través de la familia de factores de crecimiento BMP se encuentra dentro de los primeros eventos que activan el programa de

diferenciación cardíaca. En gastrulación, el endodermo aumenta la producción de BMP-2 y otras señales inductoras de la diferenciación del mesodermo precardiaco como FGF y CERBERUS (antagonista de la señalización de WNT). El balance de estas señales pro-cardiogénicas y de señales inhibitorias provenientes de la notocorda y del ectodermo como la vía canónica de los WNT y otros antagonistas de BMP (como la expresión de *Nogina* y *Cordina*) limitan el territorio cardíaco (Moorman y Christoffels, 2003; Srivastava, 2006; Brand, 2010; López-Sánchez y García-Martínez, 2011; Fig.32).

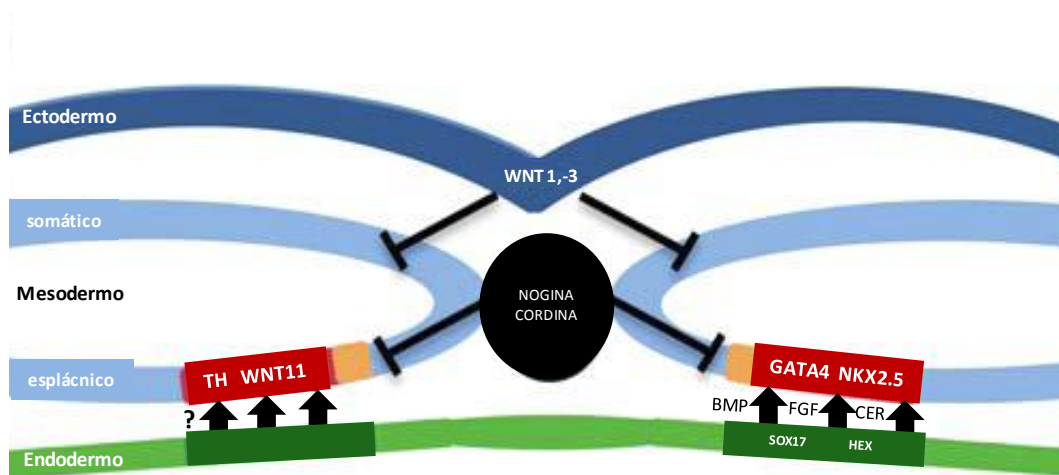


Figura 32. Descripción esquemática de una sección transversal a través de la región embrionaria del campo cardíaco de st 5. Los campos cardíacos (rojo) son parte del mesodermo esplácneo de la línea lateral (azul claro). Los factores de inducción cardíaca derivan del endodermo (verde claro), particularmente endodermo faríngeo (verde oscuro), que expresa *Sox17* y *Hex*. Los inductores cardíacos derivados del endodermo incluyen BMP, FGF y los antagonistas de WNT como CERBERUS (Cer), y activan la expresión de *Nkx2.5* y *Gata4* en el mesodermo cardíaco. Los factores WNT del ectodermo (azul oscuro) y los antagonistas de BMP (NOGINA y CORDINA), secretados desde la notocorda (en negro) limitan la cantidad de tejido cardíaco que va a desarrollarse. Estos inhibidores están implicados también en retardar la diferenciación de la población de precursores cardíacos del campo cardíaco secundario, localizada de manera más medial (naranja), la cual formará el tracto de entrada y salida del corazón maduro. La TH se expresa en el mesodermo cardíaco, y potenciaría la especificación y la regionalización cardíaca. (Modificado de Brand, 2010).

La expresión de *Bmp-2* activa la expresión del núcleo principal de factores de transcripción de cardiogénesis (*Nkx2.5*, *Gata*, *Tbx*...) a través de la señalización mediante TAK/TAB, ATF2 y SMAD (Schulteiss *et al*, 1997; Monzen *et al*, 1999 y 2001; Liberatore *et al*, 2002; Lien *et al*, 2002). La familia SMAD, además de intervenir en la diferenciación miocárdica (revisado en Brand, 2003), media interacciones génicas que regulan proliferación y diferenciación en otros procesos del desarrollo embrionario, como la señalización en la transición epitelio-mesénquima (Dijke y Heldin, 2006). Nuestros resultados sugieren que la dopamina podría potenciar la vía cardiogénica, al menos en parte, aumentando los niveles de BMP-2 (Fig. 18).

En este escenario, resultaría interesante observar la relación de la TH y la dopamina con la expresión de otros factores tempranos, además de BMP-2, implicados en cardiogénesis que provienen del endodermo u otros tejidos adyacentes, como la familia de los FGF o WNT, y de otras vías importantes dentro de este proceso, como la vía de la proteína kinasa C, las kinasas c-Jun N-terminal o la vía de NOTCH (Brand, 2003; Moorman y Christoffels, 2003; Niessen y Karsan, 2008).

La disminución de la expresión de marcadores cardíacos tras el bloqueo de la síntesis endógena de dopamina junto con la falta de detección de noradrenalina y adrenalina (López-Sánchez *et al*, 2010; Fig. 16), indican que la dopamina es la molécula activa en cardiogénesis en estos estadios. Mediante RT-qPCR hemos detectado la expresión de receptores de las familias *D1* y *D2* en el tubo cardíaco de st 10 y st 12 (Fig. 24) siendo posible la señalización de la dopamina vía su(s) receptor(es). Futuros experimentos de nuestro grupo están dirigidos a la caracterización molecular de la ruta de señalización de la dopamina en cardiogénesis.

7.3. Implicación de la TH en el establecimiento de patrones en el tubo cardíaco.

Los resultados aquí presentados indican que la TH/L-DOPA/dopamina está involucrada en la red de señales que dirigen el establecimiento de la polaridad antero-posterior del tubo cardíaco mediante la regionalización de la expresión de *Tbx5* y de *Amhc-1*.

El análisis de la expresión de *Th* muestra un enriquecimiento progresivo del mRNA de *Th* en la región posterior del tubo cardíaco (Fig. 14). La perturbación de la expresión graduada de la *Th* alteró la segregación de las miosinas auriculares y ventriculares. Mientras que un incremento en los niveles de la TH provocó una expansión del dominio auricular de *Amhc-1* y de *Tbx5* (Fig. 19 y 20), y una regresión del dominio ventricular de *Vmhc-1* y de *lrx4*, la pérdida de la actividad de la TH disminuyó la expresión de *Amhc-1* y *Tbx5*, y ocasionalmente expandió la expresión de *Vmhc-1* en el sector auricular (López-Sánchez *et al*, 2010). El fenotipo ocasional de expansión de *Vmhc-1* indica la presencia de otros factores implicados en restringir la expresión de *Vmhc-1*. Se ha mostrado que la expresión graduada de *Tbx5* es crucial para el establecimiento del patrón anteroposterior del tubo cardíaco primitivo, dado que la disrupción de este patrón provoca anomalías en la formación de las cámaras cardíacas (Bruneau *et al*, 1999; Christoffels *et al*, 2000; Liberatore *et al*, 2000). Esta expresión graduada de *Tbx5* y la identidad posterior del tubo cardíaco primitivo son mantenidas por el AR. Un exceso de AR causa expansión hacia la región anterior de genes que normalmente se restringen a la región posterior, como *Amhc-1* y *Tbx5*, y además se produce una hiperplasia de la región posterior del tubo (Mendelsohn *et al* 1994; Yutzey *et al*, 1994; Liberatore *et al*, 2000; Hochgreb *et al* 2003; Xavier-Neto *et al*, 2001; Fig. 21). De manera inversa, la inhibición de la señalización a través del retinoico aumenta el desarrollo de la región ventricular (Hochgreb *et al*, 2003; Niederreither *et al*, 2001; Fig. 22). En nuestros experimentos hemos observado un paralelismo entre el efecto del bloqueo de la expresión de la *Th* endógena y la inhibición de la señalización por el AR (Hochgreb *et al*, 2003). Así mismo, hemos comprobado que la expresión de la *Th* depende de la señalización del AR. Según estos resultados, la TH parece reforzar el programa genético de la región auricular, en un escenario donde el AR modula la expresión en gradiente de la *Th* en el tubo cardíaco, y la actividad de la TH favorece la restricción de la expresión de *Tbx5* y de *Amhc-*

1 a la parte posterior del tubo cardíaco (Fig. 19 y 20), mientras que suprime la de *Irx4* y *Vmhc-1* (López-Sánchez *et al*, 2010; Fig. 33).

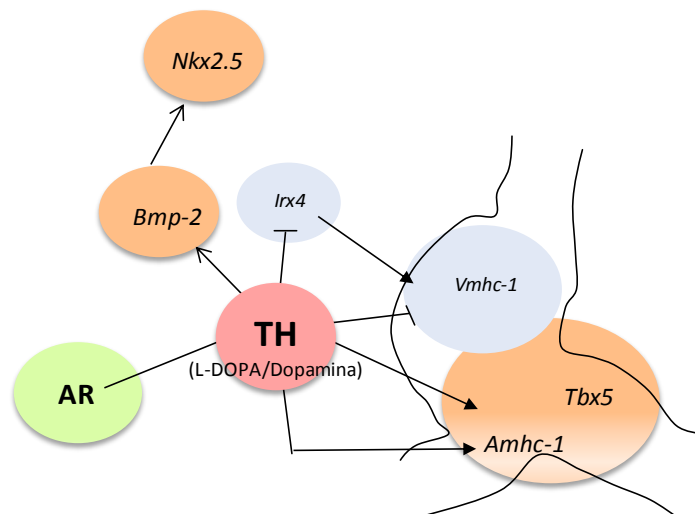


Figura 33. Esquema del papel de la TH en la regulación de la red génica implicada en la cardiogénesis del embrión de pollo.

La alteración de la expresión de la *Th* (ganancia o pérdida) tuvo también importantes consecuencias funcionales. El aumento de la expresión de la *Th* disminuyó la frecuencia cardíaca y provocó latidos arrítmicos (Tabla 3 y CD anexo), mientras que la pérdida de la actividad de la TH provocó torsión parcial y latido discontinuo del tubo cardíaco (López-Sánchez *et al*, 2010). La causa de esta anomalía funcional es una cuestión abierta. Estudios previos han mostrado que la restricción de la expresión de proteínas contráctiles en sus respectivas cámaras ventriculares y auriculares, incluyendo las miosinas de cadena ligera y pesada, es esencial para una función cardíaca normal (Buck *et al*, 1999; Chen *et al*, 1998; Pawloski-Dahm *et al*, 1998). Dado que la sobreexpresión de la *Th* altera la distribución de las isoformas ventriculares y auriculares de las cadenas de miosina pesada (Fig. 19 y 20; López-Sánchez *et al*, 2010) esto podría ser, al menos parcialmente, responsable de algunas de las anomalías de la función cardíaca encontradas en los embriones con expresión de *Th* desregulada.

No obstante, también es posible especular que la TH podría estar implicada en la especificación del marcapasos cardíaco del corazón embrionario. En el embrión de pollo, el marcapasos se diferencia en st 9-10 en el segmento más posterior del tubo cardíaco (Kamino *et al*, 1981), asegurando la propagación rítmica del potencial de acción con polaridad anteroposterior. La bradiarritmia de los embriones que sobreexpresan *Th* (Tabla 3), unido a la restricción de la expresión de la *Th* a la región posterior (Fig. 14, 15 y 16), son compatibles con la interpretación de que el gradiente de TH en el tubo cardíaco primitivo puede ser parte de las señales que afectan a la dominancia del marcapasos en la parte posterior del tubo, y además participar en el desarrollo del futuro nodo auricular responsable de la actividad marcapasos en el corazón adulto. Esta hipótesis es consistente con la propuesta de Pollack (1977) (revisada por Ebert, 2006) que afirma que las catecolaminas son esenciales para la especificación del marcapasos cardíaco. y con la identificación de células cardíacas intrínsecas capaces de

sintetizar catecolaminas, en corazones humanos y en roedores, en etapas previas a la innervación (Ebert y Thompson, 2001; Huang *et al*, 1996). En roedores, las células cardíacas catecolaminérgicas parecen estar asociadas con el marcapasos y el sistema de conducción (Ebert y Thompson, 2001). Experimentos futuros analizando la expresión de genes relacionados con la formación del marcapasos cardíaco, entre otros, ayudarán a clarificar el papel de la TH en la especificación de este tejido.

Los modelos murinos deficientes en la síntesis de catecolaminas (mutantes nulos para *Th* y *Dbh*) (Kobayashi *et al*, 1995; Thomas *et al*, 1995; Zhou *et al*, 1995) son letales embrionarios. El estudio de estos ratones han mostrado que las catecolaminas, en particular la noradrenalina, median en la supervivencia fetal manteniendo la homeostasis del oxígeno en etapas de gestación media (Portbury *et al*, 2003; Ream *et al*, 2008), estadios posteriores a los analizados en el embrión de pollo en esta Tesis. Sin embargo, en estudios previos de nuestro laboratorio hemos podido detectar expresión de la *Th* en el embrión completo de ratón desde estadios de gastrulación (E6.5) y en el corazón desde E8.5 (los estadios más tempranos analizados) (López-Sánchez *et al*, 2010). Así mismo, Thomas *et al* (1995), encontraron que la dopamina era la única catecolamina detectada en embriones de ratón de E9.5 (varios días antes de que ocurriera la letalidad). Nuestros resultados son compatibles con los descubrimientos en ratón: la dopamina juega un papel importante en la formación del tubo cardíaco, mientras que la noradrenalina puede ser esencial para supervivencia fetal en etapas medias de gestación. Además, la ausencia aparente de alteraciones histológicas en los ratones nulos para enzimas de la síntesis de catecolaminas puede ser debido a la presencia de factores compensatorios, incluyendo la contribución de catecolaminas maternas (Thomas *et al*, 1995) o a la variación entre especies. Se requiere una caracterización detallada del fenotipo en la organogénesis del embrión de ratón para comprender totalmente el papel de las catecolaminas en la cardiogénesis en esta especie.

7.4. Expresión de la *Th* en el proepicardio.

Otro tejido embrionario de gran relevancia en el desarrollo cardíaco en el que también hemos encontrado expresión de la *Th* es el proepicardio. Este tejido embrionario de formación transitoria da lugar a varias poblaciones cardíacas. Por una parte, forma la capa mas externa del corazón, el epicardio, y por otra da lugar a los fibroblastos y a las células musculares lisas de la vasculatura coronaria (Muñoz-Chapuli *et al*, 2002; Pérez-Pomares *et al*, 2009). La contribución del proepicardio a la formación de cardiomiocitos *in vivo* es una cuestión discutida actualmente (Zhou *et al*, 2008; Cai *et al*, 2008; Christoffels *et al*, 2009; Mommersteg *et al* 2010) aunque ha sido altamente probado su potencial cardiogénico *in vitro* (Kruithof *et al*, 2006; Van Wijk *et al*, 2009).

La *Th* se expresa en la región donde se localizan los precursores del proepicardio, el asta derecha de la región posterior del tubo cardíaco, desde las primeras etapas de su especificación (st 12-13), y continúa expresándose durante la formación del proepicardio (st 14-17) en los componentes epiteliales y mesenquimales de éste (Fig. 16). Actualmente, nuestro grupo está estudiando la posible función de la TH en la formación del proepicardio y de las poblaciones generadas a partir de él. Una hipótesis atractiva es que la TH podría estar

potenciando la capacidad cardiogénica del proepicardio, mediada por BMP2, de manera similar a lo que hemos demostrado durante la cardiogénesis temprana. En un estudio reciente se ha mostrado que el balance de la señalización de BMP y FGF determina el destino de los precursores mesoteliales cercanos al proepicardio (Van Wijk *et al*, 2009; Fig.8). Mientras que BMP2 vía SMAD estimula la diferenciación a cardiomiocitos, los FGF favorecen la diferenciación a derivados epicárdicos.

7.5. Efecto de la sobreexpresión génica de la proinsulina en el desarrollo cardíaco.

El análisis de la expresión de la proinsulina en esta Tesis y en estudios previos (Hernández-Sánchez *et al*, 2003; Mansilla *et al*, 2005) ha mostrado que sus niveles proteicos están altamente regulados durante el desarrollo cardíaco. Mientras que en st 5, la forma mayoritaria del mRNA de proinsulina es la variante capaz de traducirse a proteína (*Pro1B*), según avanza el desarrollo la abundancia de esta variante disminuye a favor de la que retiene el intrón 1 (*Pro1B1*) y que tiene bloqueada su traducción. A partir de la formación del tubo cardíaco primitivo (st 10), y hasta el inicio de la formación de las cámaras y las válvulas cardíacas (st 20, último estadio analizado), la forma predominante es la que retiene el intrón 1 (*Pro1B1*) (Fig. 24 y 25).

Este patrón de expresión sugiere que la actividad biológica de la proinsulina estaría reducida a las etapas iniciales de la cardiogénesis, siendo necesaria su inhibición en etapas posteriores. Estudios previos de nuestro grupo han mostrado que la adición exógena de proinsulina es incompatible con un desarrollo correcto del embrión (de Pablo *et al*, 1985; Hernández-Sánchez *et al*, 2003). Así mismo, los experimentos de ganancia de función presentados en esta Tesis (Fig. 29 y Tabla 4) corroboran que el aumento de la expresión de proinsulina provoca importantes malformaciones, en el embrión en general y en el tubo cardíaco en particular. La severidad de estas malformaciones está relacionada con la eficiencia de traducción de las construcciones electroporadas. Así, los embriones que sobreexpresaban la variante pancreática de proinsulina que produce altos niveles de proteína (Hernández-Sánchez *et al*, 2003), presentaban las malformaciones más graves. Tras la sobreexpresión del transcrito *Pro1A*, el tubo cardíaco no llegaba a formarse en un 38,9% de los casos, mientras que en los que sobreexpresaban la variante embrionaria *Pro1B*, que produce niveles moderados de proinsulina, siempre fue posible apreciar la formación del tubo cardíaco, aunque la morfogénesis de éste se encontraba afectada en un 40% de los casos. El efecto dramático de la sobreexpresión del transcrito pancreático no se restringía únicamente al tubo cardíaco, sino que otras estructuras embrionarias como el proceso cefálico, las vesículas ópticas, los somitas y el tubo neural estaban también gravemente afectados.

Debido a los efectos generalizados del transcrito *Pro1A*, los estudios se continuaron con el transcrito *Pro1B*. Entre las malformaciones más comunes de los embriones que sobreexpresaban la variante *Pro1B* se encontraba la forma globular del tubo cardíaco, con un crecimiento anormal y dilatado de su porción más anteromedial. El estudio de la expresión de genes con restricción anteroposterior mostró que la proinsulina favorece la expresión de genes de la región anterior, como *Vmhc-1*, e inhibe la de genes posteriores como *Amhc-1* y *Tbx5* (Fig. 30 y 34). Este incremento y expansión de *Vmhc-1* se corresponde con el aumento de la región

anteromedial. Estos resultados se encuentran en concordancia con estudios previos de nuestro grupo en los que la implantación de microesferas impregnadas de proinsulina daba lugar a la expresión ectópica de *Vmhc-1* (Mansilla *et al*, 2005), y con estudios *in vitro* realizados con explantes de la región precardiogénica que sugieren que la insulina produce diferenciación cardíaca (Antin *et al*, 1996; Lough y Sugi, 2000).

Igualmente, la detección de proinsulina y de su receptor en el corazón embrionario de ratón (Fig. 31) permite relacionar un posible papel para este gen en el desarrollo cardíaco de otros vertebrados. Además, estos resultados sugieren que el sistema de la insulina podría estar implicado en malformaciones cardíacas embrionarias asociadas a diabetes materna en humanos.

A pesar del mayor control de las pacientes diabéticas durante el embarazo, los hijos de madre diabética presentan mayor índice, hasta cinco veces, de malformaciones cardíacas (Kumar *et al*, 2007). Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que la diabetes materna causa defectos cardíacos congénitos no se encuentran del todo caracterizados. Estudios recientes indican que estas malformaciones congénitas se asocian a la alteración de diversos tipos de señales, y no sólo como consecuencia de la hiperglicemia materna (Chang y Loeken, 1999; García-Patterson *et al*, 2004; Zhao *et al*, 2010). De hecho, existen estudios que han mostrado que la correlación entre malformaciones congénitas en niños de madres diabéticas y el índice de masa corporal es más alta que la correlación existente entre malformaciones congénitas y los valores de glucosa en sangre maternos (García-Patterson *et al*, 2004), sugiriendo que la alteración de otras moléculas contribuye a la etiología de estas malformaciones. En nuestros estudios, utilizando un sistema modelo independiente de la madre, como es el embrión de pollo, hemos comprobado que un exceso de proinsulina da lugar a importantes malformaciones cardíacas. Estos resultados sugieren que la exposición en el útero a niveles elevados de proinsulina/insulina debida a la hiperproinsulinemia/hiperinsulinemia asociada a la resistencia a insulina observada en diabéticas tipo 2 y en obesas, podría contribuir al desarrollo de malformaciones congénitas.

La señalización de proinsulina es importante en la regulación de los niveles de muerte celular. El bloqueo de la señalización de proinsulina/insulina en el embrión de pollo induce un aumento de la muerte celular (Morales *et al*, 1997; Díaz *et al*, 1999, Hernández-Sánchez *et al* 2002). Por el contrario la adición exógena de proinsulina bloquea la muerte celular natural necesaria para la correcta morfogénesis del embrión (Hernández-Sánchez *et al* 2003). Sería necesario realizar un estudio detallado para comprobar si la desregulación de la muerte celular podría ser responsable de las anomalías cardíacas observadas en los embriones que sobreexpresan los transcritos de proinsulina.

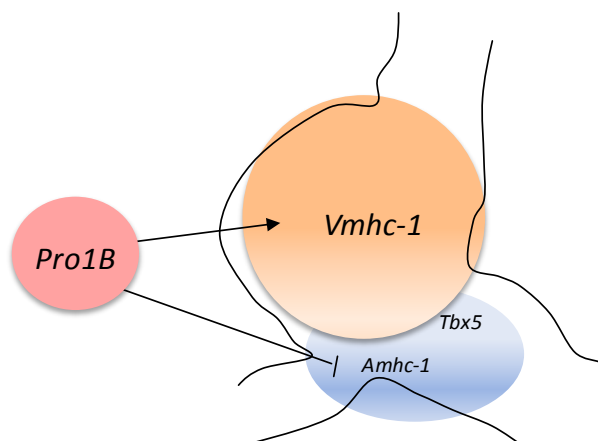


Figura 34. Efecto de la sobreexpresión del transcrito embrionario de proinsulina (*Pro1B*) en la expresión génica del tubo cardíaco primitivo. Se muestra en naranja el aumento de la expresión de la miosina ventricular *Vmhc-1* y en azul la disminución de la expresión de *Amhc-1* y *Tbx5*.

Además, se ha visto en mamíferos que la infusión crónica de insulina en ratones adultos incrementó la masa del ventrículo izquierdo y el grosor de la pared cardíaca. Sin embargo, el examen histoquímico de estos ratones mostró que este incremento en grosor se producía a través de hipertrofia celular y un aumento de la fibrosis intersticial, sin un incremento de la proliferación de los cardiomiocitos (Samuelsson *et al*, 2006). Por el contrario, un estudio similar mostró que la inyección de IGF-1 provocó cardiomegalia mediada por un incremento en el número de cardiomiocitos (Redaelli *et al*, 1998). Resultaría interesante analizar si las malformaciones observadas tras la sobreexpresión de proinsulina (Fig. 29 y Tabla 4) encuentran su origen en la hipertrofia o en un incremento de la proliferación celular.

Los requerimientos tridimensionales del desarrollo cardíaco necesitan complejas redes de señalización que dirijan a las células a través de decisiones de destino apropiadas y movimientos morfogénicos (Buckingham *et al*, 2005; Srivastava *et al*, 2006). Además, la polaridad anteroposterior juega un papel en el acoplamiento entre el corazón y los capilares sanguíneos. Aquí, revelamos una nueva función para la TH en el desarrollo cardíaco, y sugerimos que la TH puede ser un protagonista clave actuando junto a factores adicionales para definir múltiples aspectos de la identidad cameral, incluyendo la especificación del marcapasos. Estos resultados son consistentes con el siguiente paradigma: moléculas que actúan como mediadores de señalización intercelular, con papeles bien definidos y restringidos en organismos postnatales, están presentes en etapas embrionarias, donde participan en diversas funciones a menudo no relacionadas con su papel en etapas posteriores (revisado en Hernández-Sánchez *et al*, 2006; Sanders *et al*, 2008). La relevancia de la TH en la cardiogénesis humana y la posible significancia de las alteraciones de la ruta de la TH en síndromes cardíacos pueden ser campos que merezcan futuros estudios.

Por otro lado, la función de la proinsulina estaría restringida a etapas iniciales de la cardiogénesis, estando inhibida su expresión a partir de la formación del tubo cardíaco. La presencia de un exceso de proinsulina produce malformaciones cardíacas que podrían estar relacionadas con las observadas en hijos de madre diabética, poniendo de manifiesto que la proinsulina/insulina sería un nuevo factor de riesgo a tener en cuenta.

8. CONCLUSIONES.

8. CONCLUSIONES

1. La *Th* se expresa siguiendo un patrón dinámico durante las etapas iniciales de la cardiogénesis del embrión de pollo. La enzima es funcionalmente activa, y cataliza la producción de L-DOPA en el tubo cardíaco en formación. La expresión del mRNA de la *Th* es detectada también en los precursores proepicárdicos de st 12 y en el proepicardio en st 16, tanto en la población epitelial como mesenquimal del órgano.
2. La dopamina interviene en la diferenciación temprana del mesodermo precardiogénico, regulando positivamente la expresión de *Bmp-2*. En estadios posteriores, la sobreexpresión de *Th* aumenta la expresión de *Amhc-1* y *Tbx5* en la región anteromedial del tubo cardíaco. Como consecuencia de esta alteración, los corazones embrionarios presentan alteraciones funcionales, siendo posible detectar la aparición de arritmias y un descenso en la frecuencia cardíaca.
3. La TH interviene en el establecimiento del patrón anteroposterior del tubo cardíaco, encontrándose bajo el control de la vía del AR. Tanto la adición de AR como la inhibición de su síntesis provocan cambios en el área de expresión del mRNA de la *Th*. En conjunto, estos datos muestran un papel definido para la TH y sus productos (L-DOPA y dopamina) en la inducción y en la regionalización del corazón embrionario.
4. El transcrito mayoritario de proinsulina presente en la etapa de formación y torsión del tubo cardíaco es *Pro1B1*, isoforma que tiene bloqueada su traducción a proteína. La sobreexpresión en la región cardíaca de las isoformas pancreática (*Pro1A*) y embrionaria (*Pro1B*) del mRNA de la proinsulina provoca alteraciones morfológicas cuya severidad se correlaciona con la cantidad de proteína que producen.
5. La expresión de genes con restricción posterior (*Amhc-1* y *Tbx5*) se ve disminuida tras la sobreexpresión del transcrito embrionario de proinsulina (*Pro1B*). Por otro lado, aumenta la expresión de la miosina ventricular *Vmhc-1*. Estos datos nos muestran como la expresión de la proinsulina en el desarrollo cardíaco se encuentra estrictamente regulada, y su aumento interfiere directamente en la regulación de la formación de las cámaras cardíacas.

9. BIBLIOGRAFÍA.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abu-Issa R, Kirby ML. Heart field: from mesoderm to heart tube. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23:45-68.
2. Abu-Issa R, Kirby ML. Patterning of the heart field in the chick. *Dev Biol.* 2008; 319(2):223-33.
3. Abu-Issa R, Waldo K, Kirby ML. Heart fields: one, two or more? *Dev. Biol.* 2004; 272:81–85
4. Alarcón C, Morales AV, Pimentel B, Serna J, de Pablo F. (Pro)insulin and insulin-like growth factor I complementary expression and roles in early development. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 1998; 121(1):13-7.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biología molecular de la célula.* 2001. Ed. Omega. 842-843.
6. Antin PB, Yatskievych T, Dominguez JL, Chieffi P. Regulation of avian precardiac mesoderm development by insulin and insulinlike growth factors. *J Cell Physiol.* 1996; 168:42–50.
7. Ast G. How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Gen.* 2004; 773-782
8. Azambuja AP, Portillo-Sánchez V, Rodrigues MV, Omae SV, Schechtman D, Strauss BE, Costanzi-Strauss E, Krieger JE, Perez-Pomares JM, Xavier-Neto J. Retinoic acid and VEGF delay smooth muscle relative to endothelial differentiation to coordinate inner and outer coronary vessel wall morphogenesis. *Circ Res.* 2010; 107(2):204-16.
9. Bao ZZ, Bruneau BG, Seidman JG, Seidman CE, Cepko CL. Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by *Irxd4*. *Science.* 1999; 283(5405):1161-4.
10. Bártošová E, Krejčí J, Harnicarová A, Galiová G, Kozubek S. Histone modifications and nuclear architecture: a review. *J Histochem Cytochem.* 2008; 56(8):711-21.
11. Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J, Grayzel D, Kroumpouzou E, Traill TA, Leblanc-Straceski J, Renault B, Kucherlapati R, Seidman JG, Seidman CE. Mutations in human *TBX5* [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nat Genet.* 1997; 15(1):30-5. Erratum in: *Nat Genet* 1997; 15(4):411.
12. Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME, Pham M, Zhang D, Cooksey RC, McClain DA, Litwin SE, Taegtmeyer H, Severson D, Kahn CR, Abel ED. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest.* 2002; 109:629–639
13. van den Berg G, Abu-Issa R, de Boer BA, Hutson MR, de Boer PA, Soufan AT, Ruijter JM, Kirby ML, van den Hoff MJ, Moorman AF. A caudal proliferating growth center contributes to both poles of the forming heart tube. *Circ Res.* 2009; 104(2):179-88.

14. Bisaha JG, Bader D. Identification and characterization of a ventricular-specific avian myosin heavy chain, VMHC1: Expression in differentiating cardiac and skeletal muscle. *Dev Biol.* 1991; 148:355-364.
15. Brett D, Pospisil H, Valcarcel J, Reich J, Bork P. Alternative splicing and genome complexity. *Nature Genet.* 2002; 30:29–30.
16. Brand T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. *Dev Biol.* 2003; 258(1):1-19.
17. Brand T. Molecular networks in cardiac development. *Cell Signaling and Growth Factors in Development: From Molecules to Organogenesis.* 2006; Ed. Wiley-VCH. 841-878
18. Brand T. Exciting news: catecholamines in induction and regionalization of the heart. *Cardiovasc Res.* 2010; 88(1):1-2.
19. Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S, Conner DA, Gessler M, Nemer M, Seidman CE, Seidman JG. A murine model of Holt-Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor Tbx5 in cardiogenesis and disease. *Cell.* 2001; 106(6):709-21.
20. Bruneau BG, Logan M, Davis N, Levi T, Tabin CJ, Seidman JG, Seidman CE. Chamber-specific cardiac expression of Tbx5 and heart defects in Holt-Oram syndrome. *Dev Biol.* 1999; 211(1):100-8.
21. Buck SH, Konyn PJ, Palermo J, Robbins J, Moss RL. Altered kinetics of contraction of mouse atrial myocytes expressing ventricular myosin regulatory light chain. *Am J Physiol.* 1999; 276(4 Pt 2):H1167-71.
22. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet.* 2005; 6(11):826-35.
23. Cai CL, Martin JC, Sun Y, Cui L, Wang L, Ouyang K, Yang L, Bu L, Liang X, Zhang X, Stallcup WB, Denton CP, McCulloch A, Chen J, Evans SM. A myocardial lineage derives from Tbx18 epicardial cells. *Nature.* 2008; 454:104-8.
24. Carlson BM. *Embriología humana y biología del desarrollo.* 2009. Ed Elsevier. 429-476.
25. Carroll SB. Evo-devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. *Cell.* 2008; 134(1):25-36.
26. Carninci P. Tagging mammalian transcription complexity. *Trends in Genetics.* 2006; 9: 501-510
27. Chang TI, Loeken MR. Genotoxicity and diabetic embryopathy: impaired expression of developmental control genes as a cause of defective morphogenesis. *Semin Reprod Endocrinol.* 1999; 17(2):153-65.
28. Chapman SC, Collignon J, Schoenwolf GC, Lumsden A. Improved method for chick whole-embryo culture using a filter paper carrier. *Dev Dyn.* 2001; 220:284-289

29. Chen J, Kubalak SW, Minamisawa S, Price RL, Becker KD, Hickey R, Ross J Jr, Chien KR. Selective requirement of myosin light chain 2v in embryonic heart function. *J Biol Chem*. 1998; 273(2):1252-6.
30. Christoffels VM, Grieskamp T, Norden J, Mommersteeg MT, Rudat C, Kispert A. Tbx18 and the fate of epicardial progenitors. *Nature*. 2009; 458:E8-9.
31. Christoffels VM, Habets PE, Franco D, Campione M, de Jong F, Lamers WH, Bao ZZ, Palmer S, Biben C, Harvey RP, Moorman AF. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol*. 2000; 223(2):266-78.
32. Clamp M, Fry B, Kamal M, Xie X, Cuff J, Lin MF, Kellis M, Lindblad-Toh K, Lander ES. Distinguishing protein-coding and noncoding genes in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(49):19428-33.
33. Colas JF, Lawson A, Schoenwolf GC. Evidence that translation of smooth muscle alpha-actin mRNA is delayed in the chick promyocardium until fusion of the bilateral heart-forming regions. *Dev. Dyn*. 2000; 218:316-30
34. Colas, J.F. and Schoenwolf, G.C. Assessing the contributions of gene products to the form-shaping events of neurulation: a transgenic approach in chick. *Genesis*. 2003; 37: 64-75.
35. Crackower MA, Oudit GY, Kozieradzki I, Sarao R, Sun H, Sasaki T, Hirsch E, Suzuki A, Shioi T, Irie-Sasaki J, Sah R, Cheng HY, Rybin VO, Lembo G, Fratta L, Oliveira-dos-Santos AJ, Benovic JL, Kahn CR, Izumo S, Steinberg SF, Wymann MP, Backx PH, Penninger JM. Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways. *Cell*. 2002; 110(6):737-49.
36. DeBosch BJ, Muslin AJ. Insulin signaling pathways and cardiac growth. *J Mol Cell Cardiol*. 2008; 44(5):855-64.
37. De la Cruz MV, Sánchez Gómez C, Arteaga MM, Argüello C.J. Experimental study of the development of the truncus and the conus in the chick embryo. *Anat*. 1977; 123(Pt 3):661-86.
38. Deltour L, Leduque P, Blume N, Madsen O, Dubois P, Jami J, Bucchini D. Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90(2):527-31.
39. Deschamps AM, Spinale FG. Matrix modulation and heart failure: new concepts question old beliefs. *Curr Opin Cardiol*. 2005; 20(3):211-6.
40. Díaz B, Serna J, De Pablo F, de la Rosa EJ. In vivo regulation of cell death by embryonic (pro)insulin and the insulin receptor during early retinal neurogenesis. *Development*. 2000; 127(8):1641-9.
41. Dijke P, Heldin CH. *Smad signal transduction: Smads in proliferation, differentiation and disease*. 2006. Ed Springer. 93-151.

42. Dyer LA, Kirby ML. The Role of Secondary Heart Field in Cardiac Development. *Dev Biol.* 2009; 336(2): 137–144.
43. Ebert SN, Taylor DG. Catecholamines and development of cardiac pacemaking: an intrinsically intimate relationship. *Cardiovasc Res* 2006; 72:364-374
44. Ebert SN, Thompson RP. Embryonic epinephrine synthesis in the rat heart before innervation: association with pacemaking and conduction tissue development. *Circ Res* 2001; 88:117-124
45. Ebina Y, Edery M, Ellis L, Standring D, Beaudoin J, Roth RA, Rutter WJ. Expression of a functional human insulin receptor from a cloned cDNA in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(23):8014-8.
46. Ehrman LA, Yutzey KE. Lack of regulation in the heart forming region of avian embryos. *Dev Biol.* 1999; 207(1):163-75.
47. Evans SM. Vertebrate tinman homologues and cardiac differentiation. *Semin Cell Dev Biol.* 1999; 10(1):73-83.
48. Ferone D, Gatto F, Arvigo M, Resmini E, Boschetti M, Teti C, Esposito D, Minuto F. The clinical-molecular interface of somatostatin, dopamine and their receptors in pituitary pathophysiology. *J Mol Endocrinol.* 2009; 42(5):361-70.
49. Fior R, Henrique D. A novel hes5/hes6 circuitry of negative regulation controls Notch activity during neurogenesis. *Dev Biol.* 2005; 281:318-333.
50. Fitzpatrick PF. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:355-381.
51. García-de Lacoba M, Alarcón C, de la Rosa EJ, de Pablo F. Insulin/insulin-like growth factor-I hybrid receptors with high affinity for insulin are developmentally regulated during neurogenesis. *Endocrinology.* 1999; 140(1):233-43.
52. Garcia-Martinez V, Schoenwolf GC. Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Dev Biol.* 1993; 159(2):706-19.
53. García-Patterson A, Erdozain L, Ginovart G, Adelantado JM, Cubero JM, Gallo G, de Leiva A, Corcoy R. In human gestational diabetes mellitus congenital malformations are related to pre-pregnancy body mass index and to severity of diabetes. *Diabetologia.* 2004; 47(3):509-14.
54. Gelain DP, Moreira JC, Bevilaqua LR, Dickson PW, Dunkley PR Retinol activates tyrosine hydroxylase acutely by increasing the phosphorylation of serine40 and then serine31 in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 2007; 103:2369-2379.
55. Girault JA, Greengard P. The neurobiology of dopamine signaling. *Arch Neurol.* 2004; 61(5):641-4.

56. González-Rosa JM, Padrón-Barthe L, Torres M, Mercader N. Estudios de linaje del epicardio durante el desarrollo y la regeneración cardíaca *P. Rev Esp Cardiol.* 2010; 63(Supl.2) :36-48
57. Gould SJ. *La estructura de la Teoría de la Evolución.* 2004. Ed. Tusquets. 715-726.
58. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, Huarte M, Zuk O, Carey BW, Cassady JP, Cabili MN, Jaenisch R, Mikkelsen TS, Jacks T, Hacohen N, Bernstein BE, Kellis M, Regev A, Rinn JL, Lander ES. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature.* 2009; 458(7235):223-7..
59. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 1951; 88:49-92.
60. Hernández-Sánchez C, Bártulos O, Valenciano AI, Mansilla A, de Pablo F. The regulated expression of chimeric tyrosine hydroxylase–insulin transcripts during early development *Nucleic Acids Research*, 2006; 34(12):3455-64
61. Hernández-Sánchez C, López-Carranza A, Alarcón C, de La Rosa EJ, de Pablo F. Autocrine/paracrine role of insulin-related growth factors in neurogenesis: local expression and effects on cell proliferation and differentiation in retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(21):9834-8.
62. Hernández-Sánchez C, Mansilla A, de la Rosa EJ, Pollerberg GE, Martínez-Salas E, de Pablo F. Upstream AUGs in embryonic proinsulin mRNA control its low translation level. *EMBO J.* 2003; 22(20):5582-92.
63. Hernández-Sánchez C, Rubio E, Serna J, de la Rosa EJ, de Pablo F. Unprocessed proinsulin promotes cell survival during neurulation in the chick embryo. *Diabetes.* 2002; 51(3):770-7.
64. Hochgreb T, Linhares VL, Menezes DC, Sampaio AC, Yan CY, Cardoso WV, Rosenthal N, Xavier-Neto J. A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field. *Development.* 2003; 130(22):5363-74.
65. Huang MH, Friend DS, Sunday ME, Singh K, Haley K, Austen KF, Kelly RA, Smith TW. An intrinsic adrenergic system in mammalian heart. *J Clin Invest* 1996; 98:1298-1303
66. Humphery-Smith I. A human proteome project with a beginning and an end. *Proteomics.* 2004; 4(9):2519-21
67. Hutson MR, Zeng XL, Kim AJ, Antoon E, Harward S, Kirby ML. Arterial pole progenitors interpret opposing FGF/BMP signals to proliferate or differentiate. *Development.* 2010; 137(18):3001-11.
68. Ignarro LJ, Shideman FE. Appearance and concentrations of catecholamines and their biosynthesis in the embryonic and developing chick. *J Pharmacol Exp Ther.* 1968; 159(1):38-48.

69. Ilcercil A, Devereux RB, Roman MJ, Paranicas M, O'Grady MJ, Lee ET, Welty TK, Fabsitz RR, Howard BV. Associations of insulin levels with left ventricular structure and function in Am Indians: the strong heart study. *Diabetes*. 2002; 51:1543–1547.
70. Jurka J, Kapitonov VV, Kohany O, Jurka MV. Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2007; 8:241-59
71. Jeong H, Kim MS, Kim SW, Kim KS, Seol W. Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression by retinoic acid receptor. *J Neurochem* 2006; 98:386-394.
72. Kamino K, Hirota A, Fujii S. Localization of pacemaking activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye. *Nature*. 1981; 290:595-597.
73. Karijolic J, Yu YT. Spliceosomal snRNA modifications and their function. *RNA Biol*. 2010; 7(2):192-204.
74. Kellerer M, Lammers R, Ermel B, Tippmer S, Vogt B, Obermaier-Kusser B, Ullrich A, Häring HU. Distinct alpha-subunit structures of human insulin receptor A and B variants determine differences in tyrosine kinase activities. *Biochemistry*. 1992; 31(19):4588-96.
75. Kelley C, Blumberg H, Zon LI, Evans T. GATA-4 is a novel transcription factor expressed in endocardium of the developing heart. *Development*. 1993; 118(3):817-27.
76. Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME. The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell*. 2001; 1(3):435-40.
77. Kelly RG, Zammit PS, Buckingham ME. Cardiosensor mice and transcriptional subdomains of the vertebrate heart. *Trends Cardiovasc Med*. 1999; 9(1-2):3-10.
78. Kikonyogo A, Abriola DP, Dryjanski M, Pietruszko R. Mechanism of inhibition of aldehyde dehydrogenase by citral, a retinoid antagonist. *Eur J Biochem*. 1999; 262(3):704-12.
79. Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 1997; 277(5328):942-6.
80. Klein S. Outcome success in obesity. *Obes Res*. 2001; 9:354–358
81. Kobayashi K, Morita S, Sawada H, Mizuguchi T, Yamada K, Nagatsu I, Hata T, Watanabe Y, Fujita K, Nagatsu T. Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase locus results in severe catecholamine depletion and perinatal lethality in mice. *J Biol Chem* 1995; 270(45):27235-43.
82. Kruithof BP, van Wijk B, Somi S, Kruithof-de Julio M, Pérez Pomares JM, Weesie F, Wessels A, Moorman AF, van den Hoff MJ. BMP and FGF regulate the differentiation of multipotential pericardial mesoderm into the myocardial or epicardial lineage. *Dev Biol*. 2006; 295(2):507-22.
83. Kuersten S, Goodwin EB. The power of the 3'UTR: translational control and development. *Nat Rev Gen*. 2003; 4(8):626-37.

84. Kumar SD, Dheen ST, Tay SS. Maternal diabetes induces congenital heart defects in mice by altering the expression of genes involved in cardiovascular development. *Cardiovasc Diabetol*. 2007; 30:6:34.
85. Lamers WH, Wessels A, Verbeek FJ, Moorman AF, Virágh S, Wenink AC, Gittenberger-de Groot AC, Anderson RH. New findings concerning ventricular septation in the human heart. Implications for maldevelopment. *Circulation*. 1992; 86(4):1194-205.
86. Lander ES. Initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature*. 2011; 470(7333):187-97.
87. Larsen WD. *Embriología humana*. 2003. Ed. Elsevier. 157-180.
88. Lavado A, Jeffery G, Tovar V, de la Villa P, Montoliu L. Ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the pigmented epithelium rescues the retinal abnormalities and visual function common in albinos in the absence of melanin. *J Neurochem*. 2006; 96(4):1201-11.
89. Leibiger B, Leibiger IB, Moede T, Kemper S, Kulkarni RN, Kahn CR, de Vargas LM, Berggren PO. Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. *Mol Cell*. 2001; 7(3):559-70.
90. Levin M, Johnson RL, Stern CD, Kuehn M, Tabin C. A molecular pathway determining left-right asymmetry in chick embryogenesis. *Cell*. 1995; 82(5):803-14.
91. Levin M, Pagan S, Roberts DJ, Cooke J, Kuehn MR, Tabin CJ. Left/right patterning signals and the independent regulation of different aspects of situs in the chick embryo. *Dev Biol*. 1997; 189(1):57-67.
92. Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, Gebuhr T, Bullen PJ, Robson SC, Strachan T, Bonnet D, Lyonnet S, Young ID, Raeburn JA, Buckler AJ, Law DJ, Brook JD. Holt–Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet*. 1997; 15:21-29
93. Liberatore CM, Searcy-Schrick RD, Yutzey KE. Ventricular expression of tbx5 inhibits normal heart chamber development. *Dev. Biol*. 2000; 223:169-180.
94. Liberatore C, Searcy-Schrick R, Vincent E. and Yutzey K. Nkx-2.5 gene induction in mice is mediated by a Smad consensus regulatory region. *Dev. Biol*. 2002; 244: 243–256
95. Lien C, McAnally J, Richardson J, Olson E. Cardiac-specific activity of an Nkx2-5 enhancer requires an evolutionarily conserved Smad binding site. *Dev. Biol*. 2002; 244: 257–266.
96. Lopez VM, Decatur CL, Stamer WD, Lynch RM, McKay BS. L-DOPA is an endogenous ligand for OA1. *PLoS Biol*. 2008; 6(9):236.
97. López-Sánchez C, Bártulos O, Martínez-Campos E, Gañán C, Valenciano AI, García-Martínez V, De Pablo F, Hernández-Sánchez C. Tyrosine hydroxylase is expressed during

- early heart development and is required for cardiac chamber formation. *Cardiovasc Res.* 2010; 88(1):111-20.
98. López-Sánchez C, García-Martínez V. Molecular determinants of cardiac specification. *Cardiovasc Res.* 2011; 91(2):185-95.
99. López-Sánchez C, García-Martínez V, Schoenwolf GC. Localization of cells of the prospective neural plate, heart and somites within the primitive streak and epiblast of avian embryos at intermediate primitive-streak stages. *Cells Tissues Organs* 2001; 169:334-46
100. López-Sánchez C, García-Masa N, Gañan CM, García-Martínez V. Movement and commitment of primitive streak precardiac cells during cardiogenesis. *Int J Dev Biol.* 2009; 53(8-10):1445-55.
101. Lough J, Sugi Y. Endoderm and heart development. *Dev Dyn.* 2000; 217: 327-342
102. Lyons GE, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P, Buckingham M. Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J Cell Biol.* 1990; 111(6 Pt 1):2427-36.
103. Mansilla A, López-Sánchez C, de la Rosa EJ, García-Martínez V, Martínez-Salas E, de Pablo F, Hernández-Sánchez C. Developmental regulation of a proinsulin messenger RNA generated by intron retention. *EMBO Rep.* 2005; 6(12):1182-7.
104. Marvin MJ, Di Rocco G, Gardiner A, Bush SM, Lassar AB. Inhibition of Wnt activity induces heart formation from posterior mesoderm. *Genes Dev.* 2001; 15:316-327
105. McClain DA. Different ligand affinities of the two human insulin receptor splice variants are reflected in parallel changes in sensitivity for insulin action. *Mol. Endocrinol.* 1991; 5:734-739.
106. Meier S, Solursh M. Mediation of growth hormone-enhanced expression of the cartilage phenotype in vitro by the availability of the essential amino acid valine. *Dev Biol* 1973; 30:290-306.
107. Mendelsohn C, Lohnes D, Décimo D, Lufkin T, LeMeur M, Chambon P, Mark M. Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development.* 1994; 120(10):2749-71
108. Merki E, Zamora M, Raya A, Kawakami Y, Wang J, Zhang X, Burch J, Kubalak SW, Kaliman P, Belmonte JC, Chien KR, Ruiz-Lozano. Epicardial retinoid X receptor alpha is required for myocardial growth and coronary artery formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(51):18455-60.
109. Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R, Norris RA, Kern MJ, Eisenberg CA, Turner D, Markwald RR. The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol.* 2001; 238: 97-109.

110. Moreno-Rodriguez RA, Krug EL, Reyes L, Villavicencio L, Mjaatvedt CH, Markwald RR. Bidirectional fusion of the heart-forming fields in the developing chick embryo. *Dev Dyn*. 2006; 235(1):191-202
111. del Monte G, Casanova JC, Guadix JA, MacGrogan D, Burch JB, Pérez-Pomares JM, de la Pompa JL. Differential Notch signaling in the epicardium is required for cardiac inflow development and coronary vessel morphogenesis. *Circ Res*. 2011; 108(7):824-36.
112. Monzen K, Hiroi Y, Kudoh S, Akazawa H, Oka T, Takimoto E, Hayashi D, Hosoda T, Kawabata M, Miyazono K, Ishii S, Yazaki Y, Nagai R, Komuro I. Smads, TAK1, and their common target ATF-2 play a critical role in cardiomyocyte differentiation. *J. Cell Biol*. 2001; 153: 687–698.
113. Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, Kudoh S, Oka T, Takimoto E, Hayashi D, Hosoda T, Habara-Ohkubo A, Nakaoka T, Fujita T, Yazaki Y, Komuro I. Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol. Cell. Biol*. 1999; 19: 7096–7105.
114. Moorman AF, Christoffels VM. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol Rev*. 2003; 83(4):1223-67
115. Moorman AF, Christoffels VM, Anderson RH. Anatomic substrates for cardiac conduction. *Heart Rhythm*. 2005; 2(8):875-86.
116. Mommersteeg MT, Domínguez JN, Wiese C, Norden J, de Gier-de Vries C, Burch JB, Kispert A, Brown NA, Moorman AF, Christoffels VM. The sinus venosus progenitors separate and diversify from the first and second heart fields early in development. *Cardiovasc Res*. 2010; 87(1):92-101.
117. Morales AV, de Pablo F. Inhibition of gene expression by antisense oligonucleotides in chick embryos in vitro and in vivo. *Curr Top Dev Biol*. 1998; 36:37-49.
118. Mosthaf L, Grako K, Dull TJ, Coussens L, Ullrich A, McClain DA. Functionally distinct insulin receptors generated by tissue-specific alternative splicing. *EMBO J*. 1990; 9(8):2409-13.
119. Morales AV, Serna J, Alarcón C, de la Rosa EJ, de Pablo F. Role of prepancreatic (pro)insulin and the insulin receptor in prevention of embryonic apoptosis. *Endocrinology*. 1997; 138(9):3967-75.
120. Muñoz-Chápuli R, Macías D, González-Iriarte M, Carmona R, Atencia G, Pérez-Pomares JM. [The epicardium and epicardial-derived cells: multiple functions in cardiac development]. *Rev Esp Cardiol*. 2002; 55(10):1070-82.
121. Murphy AE, Harvey S. Extrapituitary TSH and GH in early chick embryos. *Mol Cell Endocrinol*. 2001; 185:161–171.
122. Nakae J, Kido Y, Accili D. Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev*. 2001. 22:818–835.

123. Nakajima Y, Morishima M, Nakazawa M, Momma K, Nakamura H. Distribution of fibronectin, type I collagen, type IV collagen, and laminin in the cardiac jelly of the mouse embryonic heart with retinoic acid-induced complete transposition of the great arteries. *Anat Rec.* 1997; 249(4):478-85.
124. Nicholas SB, Philipson KD. Cardiac expression of the Na(+)/Ca(2+) exchanger NCX1 is GATA factor dependent. *Am J Physiol.* 1999; 277(1 Pt 2):324-30.
125. Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, Schuhbaur B, Chambon P, Dolle P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development* 2001; 128:1019-1031.
126. Niessen K, Karsan A. Notch signaling in cardiac development. *Circ Res.* 2008; 102(10):1169-81.
127. O'Brien TX, Lee KJ, Chien KR. Positional specification of ventricular myosin light chain 2 expression in the primitive murine heart tube. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(11):5157-61.
128. Olson EN. A decade of discoveries in cardiac biology. *Nat Med.* 2004; 10(5):467-74.
129. Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science* 2006; 313:1922-1926
130. de Pablo F, Girbau M, Gomez JA, Hernandez E, Roth J. Insulin antibodies retard and insulin accelerates growth and differentiation in early embryos. *Diabetes.* 1985; 34(10):1063-7.
131. Parra G, Reymond A, Dabbouseh N, Dermitzakis ET, Castelo R, Thomson TM, Antonarakis SE, Guigo R. Tandem chimerism as a means to increase protein complexity in the human genome. *Genome Res.* 2006; 16: 37-44.
132. Patton SJ, Luke GN, Holland PW. Complex history of a chromosomal paralogy region: insights from amphioxus aromatic amino acid hydroxylase genes and insulin-related genes. *Mol. Biol. Evol.* 1998; 15, 1373-1380.
133. Pawloski-Dahm CM, Song G, Kirkpatrick DL, Palermo J, Gulick J, Dorn GW 2nd, Robbins J, Walsh RA. Effects of total replacement of atrial myosin light chain-2 with the ventricular isoform in atrial myocytes of transgenic mice. *Circulation.* 1998; 97(15):1508-13.
134. de Pedro N, Alonso-Gomez AL, Gancedo B, Valenciano AI, Delgado MJ, Alonso-Bedate M. Effect of alpha-helical-CRF[9-41] on feeding in goldfish: involvement of cortisol and catecholamines. *Behav. Neurosci.* 1997; 111:398-403
135. Pendleton RG, Rasheed A, Roychowdhury R, Hillman R. A new role for catecholamines: ontogenesis. *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19:248-251.
136. Pérez-Pomares JM, González-Rosa JM, Muñoz-Chápuli R. Building the vertebrate heart - an evolutionary approach to cardiac development. *Int J Dev Biol.* 2009; 53(8-10):1427-43.

137. Pérez-Pomares JM, Macías D, García-Garrido L, Muñoz-Chápuli R. Contribution of the primitive epicardium to the subepicardial mesenchyme in hamster and chick embryos. *Dev Dyn*. 1997; 210(2):96-105.
138. Pete G, Fuller CR, Oldham JM, Smith DR, D'Ercole AJ, Kahn CR, Lund PK. Postnatal growth responses to insulin-like growth factor I in insulin receptor substrate-1-deficient mice. *Endocrinology*. 1999; 140(12):5478-87.
139. Portbury AL, Chandra R, Groelle M, McMillian MK, Elias A, Herlong JR, Rios M, Roffler-Tarlov S, Chikaraishi DM. Catecholamines act via a beta-adrenergic receptor to maintain fetal heart rate and survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284: 2069-207
140. Pollack GH. Cardiac pacemaking: an obligatory role of catecholamines? *Science* 1977; 196:731-738.
141. Prada JA, Verastegui C, Perez-Rios N, Gonzalez-Moreno M, Fdez-Trujillo FJ. Thyrotropin-like immunoreactivity in the developing chick retina.. *Eur J Morphol* 2000; 38:34–40.
142. Prakash T, Sharma VK, Adati N, Ozawa R, Kumar N, Nishida Y, Fujikake T, Takeda T, Taylor TD. Expression of conjoined genes: another mechanism for gene regulation in eukaryotes. *PLoS One*. 2010; 5(10): 13284.
143. Ream MA, Chandra R, Peavey M, Ray AM, Roffler-Tarlov S, Kim HG, Wetsel WC, Rockman HA, Chikaraishi DM. High oxygen prevents fetal lethality due to lack of catecholamines. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295:942-953.
144. Redaelli G, Malhotra A, Li B, Li P, Sonnenblick EH, Hofmann PA, Anversa P. Effects of constitutive overexpression of insulin-like growth factor-1 on the mechanical characteristics and molecular properties of ventricular myocytes. *Circ Res*. 1998 23; 82(5):594-603.
145. Redkar A, Montgomery M, Litvin J. Fate map of early avian cardiac progenitor cells. *Development*. 2001; 128(12):2269-79.
146. Rochais F, Mesbah K, Kelly RG. Signaling pathways controlling second heart field development. *Circ Res*. 2009; 104(8):933-42.
147. Rhodes CJ. *Processing of the insulin molecule. Diabetes mellitus: a fundamental and clinical text*. Ed. Lippincott Williams & Williams. 20-338
148. Samuelsson AM, Bollano E, Mobini R, Larsson BM, Omerovic E, Fu M, Waagstein F, Holmäng A., Hyperinsulinemia: effect on cardiac mass/function, angiotensin II receptor expression, and insulin signaling pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291: H787–H796
149. Sanders EJ, Harvey S. Peptide hormones as developmental growth and differentiation factors. *Dev Dyn*. 2008; 237:1537-1552

150. Schallreuter KU, Kothari S, Chavan B, Spencer JD. Regulation of melanogenesis--controversies and new concepts. *Exp Dermatol*. 2008; 17(5):395-404.
151. Schoenwolf GC, Garcia-Martinez V. Primitive-streak origin and state of commitment of cells of the cardiovascular system in avian and mammalian embryos. *Cell. Mol. Biol. Res*. 1995; 41(4):233-40
152. Schlueter J, Männer J, Brand T. BMP is an important regulator of proepicardial identity in the chick embryo. *Dev Biol*. 2006; 295(2):546-58.
153. Schlueter J, Brand T. A right-sided pathway involving FGF8/Snai1 controls asymmetric development of the proepicardium in the chick embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(18):7485-90.
154. Schneider VA, Mercola M. Wnt antagonism initiates cardiogenesis in *Xenopus laevis*. *Genes Dev*. 2001; 15(3):304-15
155. Schultheiss TM, Burch JB, Lassar AB. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev*. 1997; 11:451-62
156. Schulteiss, TM, Xydas S, Lassar AB. Induction of avian cardiac myogenesis by anterior endoderm. *Development*. 1995; 121:4203-4214.
157. Seino S, Bell GI. Alternative splicing of human insulin receptor messenger RNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159:312-316.
158. Seino S, Seino M, Nishi S, Bell GI. Structure of the human insulin receptor gene and characterization of its promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:114-118.
159. Seo J, Lee KJ. Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. *J Biochem Mol Biol*. 2004; 37(1):35-44.
160. Shiao MS, Liao BY, Long M, Yu HT. Adaptive evolution of the insulin two-gene system in mouse. *Genetics*. 2008; 178(3):1683-91
161. Sirbu IO, Zhao X, Duester G. Retinoic acid controls heart anteroposterior patterning by down-regulating *Isl1* through the *Fgf8* pathway. *Dev Dyn*. 2008; 237(6):1627-35.
162. Soares MB, Schon E, Henderson A, Karathanasis SK, Cate R, Zeitlin S, Chirgwin J, Efstratiadis A. RNA-mediated gene duplication: the rat preproinsulin I gene is a functional retroposon. *Mol Cell Biol*. 1985; 5(8):2090-103.
163. Solloway MJ, Harvey RP. Molecular pathways in myocardial development: a stem cell perspective. *Cardiovasc. Res*. 2003. 58(2):264-77
164. Somi S, Klein AT, Houweling AC, Ruijter JM, Buffing AA, Moorman AF, van den Hoff MJ. Atrial and ventricular myosin heavy-chain expression in the developing chicken heart: strengths and limitations of non-radioactive in situ hybridization. *J Histochem Cytochem*. 2006; 54(6):649-64.

165. Somi S, Buffing AA, Moorman AF, Van Den Hoff MJ. Dynamic patterns of expression of BMP isoforms 2, 4, 5, 6, and 7 during chicken heart development. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004; 279:636-51
166. de Simone G, Devereux RB, Daniels SR, Koren MJ, Meyer RA, Laragh JH. Effect of growth on variability of left ventricular mass: assessment of allometric signals in adults and children and their capacity to predict cardiovascular risk. *J Am Coll Cardiol*. 1995; 25:1056–1062
167. Soufan AT, van den Berg G, Ruijter JM, de Boer PA, van den Hoff MJ, Moorman AF. Regionalized sequence of myocardial cell growth and proliferation characterizes early chamber formation. *Circ Res*. 2006; 99(5):545-52.
168. Srivastava D, Olson EN. A genetic blueprint for cardiac development. *Nature*. 2000; 407(6801):221-6.
169. Srivastava D. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell*. 2006; 126(6):1037-48.
170. Steiner DF, Bell GI, Tager HS. Chemistry and biosynthesis of pancreatic protein hormones In: De Groot LJ (ed) *Endocrinology*. 1990. WB Sanders, Philadelphia. 1263-1289
171. Sugi Y, Lough J. Activin-A and FGF-2 mimic the inductive effects of anterior endoderm on terminal cardiac myogenesis in vitro. *Dev. Biol*. 1995; 168:567–74
172. Sun LY, Al-Regaiey K, Masternak MM, Wang J, Bartke A. Local expression of GH and IGF-1 in the hippocampus of GH-deficient long-lived mice. *Neurobiol Aging*. 2005. 26:929–937.
173. Tam PP, Parameswaran M, Kinder SJ, Weinberger RP. The allocation of epiblast cells to the embryonic heart and other mesodermal lineages: the role of ingression and tissue movement during gastrulation. *Development* 1997; 124:1631–42
174. Taniyama Y, Ito M, Sato K, Kuester C, Veit K, Tremp G, Liao R, Colucci WS, Ivashchenko Y, Walsh K, Shiojima I. Akt3 overexpression in the heart results in progression from adaptive to maladaptive hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 38(2):375-85.
175. Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science*. 2001; 292(5514):107-10.
176. Thomas SA, Matsumoto AM, Palmiter RD. Noradrenaline is essential for mouse fetal development. *Nature*. 1995; 374(6523):643-6.
177. Tomanek RJ, Runyan RB. *Formation of the heart and its regulation*. 2001. Ed. Birkhäuser. 99-104.
178. Travers JP, Pratten MK, Beck F. Effects of low insulin levels on rat embryonic growth and development. *Diabetes*. 1989; 38(6):773-8.

179. Ullrich A, Bell JR, Chen EY *et al* (15 co-autores). Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*. 1985; 313:756–761.
180. Ullrich A, Gray A, Tam AW, *et al* (14 co-autores). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J*. 1986; 5:2503–2512
181. Wagner M, Siddiqui MA. Signal transduction in early heart development (II): ventricular chamber specification, trabeculation, and heart valve formation. *Exp Biol Med*. 2007; 232(7):866-80.
182. Vogt B, Carrascosa JM, Ermel B, Ullrich A, Häring HU. The two isotypes of the human insulin receptor (HIR-A and HIR-B) follow different internalization kinetics. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 177(3):1013-8.
183. Wahl MC, Will CL, Lührmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. 2009; 136(4):701-18.
184. Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT, Stadt HA, Hutson MR, Platt DH, Kirby ML. Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development*. 2001; 128: 3179–3188.
185. Waldo K, Zdanowicz M, Burch J, Kumiski DH, Stadt HA, Godt RE, Creazzo TL, Kirby ML. A novel role for cardiac neural crest in heart development. *J Clin Invest*. 1999; 103(11):1499-507.
186. Wessels A, Markman MW, Vermeulen JL, Anderson RH, Moorman AF, Lamers WH. The development of the atrioventricular junction in the human heart. *Circ Res*. 1996; 78(1):110-7.
187. Wessels A, Pérez-Pomares JM. The epicardium and epicardially derived cells (EPDCs) as cardiac stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 2004; 276(1):43-57.
188. van Wijk B, van den Berg G, Abu-Issa R, Barnett P, van der Velden S, Schmidt M, Ruijter JM, Kirby ML, Moorman AF, van den Hoff MJ. Epicardium and myocardium separate from a common precursor pool by crosstalk between bone morphogenetic protein- and fibroblast growth factor-signaling pathways *Circ Res*. 2009; 105(5):431-41.
189. Wren C, Birrell G, Hawthorne G. Cardiovascular malformations in infants of diabetic mothers. *Heart* 2003; 89(10):1217-1220
190. Xavier-Neto J, Neville CM, Shapiro MD, Houghton L, Wang GF, Nikovits W Jr, Stockdale FE, Rosenthal N. A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart. *Development* 1999; 126:2677-2687.
191. Xavier-Neto J, Rosenthal N, Silva FA, Matos TG, Hochgreb T, Linhares VL. Retinoid signaling and cardiac anteroposterior segmentation. *Genesis*. 2001; 31(3):97-104.

192. Yamaguchi Y, Flier JS, Yokota A, Benecke H, Backer JM, Moller DE. Functional properties of two naturally occurring isoforms of the human insulin receptor in Chinese hamster ovary cells. *Endocrinology* 1991; 129:2058-2066.
193. Yu X, St Amand TR, Wang S, Li G, Zhang Y, Hu YP, Nguyen L, Qiu MS, Chen YP. Differential expression and functional analysis of Pitx2 isoforms in regulation of heart looping in the chick. *Development*. 2001; 128(6):1005-13.
194. Yuan S, Schoenwolf GC. Islet-1 marks the early heart rudiments and is asymmetrically expressed during early rotation of the foregut in the chick embryo. *Anat Rec*. 2000; 260(2):204-7.
195. Yutzey KE, Rhee JT, Bader D. Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart. *Development*. 1994; 120(4):871-83.
196. Zaffran S, Frasch M. Early signals in cardiac development. *Circ Res*. 2002; 91: 457-469
197. Zhang R, Su B. Small but influential: the role of microRNAs on gene regulatory network and 3'UTR evolution. *J Genet Genomics*. 2009; 36(1):1-6.
198. Zhao Z. Cardiac malformations and alteration of TGFbeta signaling system in diabetic embryopathy. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2010; 89(2):97-105.
199. Zhou B, von Gise A, Ma Q, Rivera-Feliciano J, Pu WT. Nkx2-5- and Isl1-expressing cardiac progenitors contribute to proepicardium. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 375(3):450-3.
200. Zhou QY, Palmiter RD. Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipsic, and aphagic. *Cell* 1995; 83:1197-1209
201. Zhou QY, Quaife CJ, Palmiter RD. Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature* 1995; 374:640-643.

10. ÍNDICE DE FIGURAS.

10. ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Organización genómica del locus TH/insulina en el cromosoma 5 del embrión de pollo.	18
Figura 2. Ruta de síntesis de las catecolaminas.	19
Figura 3. Esquema de un receptor dopaminérgico.	20
Figura 4. Esquema de los transcritos alternativos de proinsulina.	22
Figura 5. Esquema que muestra el receptor de insulina (IR), el receptor de IGF-I (IGF-IR) y el receptor híbrido (IR-IGF1R), destacando las subunidades α y β .	23
Figura 6. Representación esquemática de la formación del tubo cardíaco en el embrión de pollo y ratón.	25
Figura 7. Diferenciación de la pared cardíaca.	28
Figura 8. Representación esquemática del desarrollo del epicardio.	29
Figura 9. Relación espacial entre los factores de inducción cardíacos y rutas de señalización implicadas en la inducción cardiogénica.	31
Figura 10. Expresión de las isoformas de mRNA de proinsulina durante la cardiogénesis del embrión de pollo.	34
Figura 11. Desarrollo temprano del embrión de pollo.	44
Tabla 1. Cebadores utilizados para la PCR semicuantitativa.	45
Tabla 2. Cebadores y sondas utilizados para la RT-qPCR.	46
Figura 12. Implantación de microesferas en el embrión de pollo temprano.	49
Figura 13. Electroporación de embriones de pollo tempranos.	50
Figura 14. Expresión génica de la <i>Th</i> durante el desarrollo cardíaco temprano del embrión de pollo.	55
Figura 15. Actividad de la ruta de síntesis de catecolaminas en la cardiogénesis del embrión de pollo.	56
Figura 16. HIS para <i>Th</i> en embrión completo de pollo de st 12, st 15 y st 16-17.	58
Figura 17. Efecto de la dopamina en la expresión de los genes cardíacos.	58
Figura 18. Efecto de la dopamina en la expresión de <i>Bmp-2</i> .	59
Figura 19. Efecto de la ganancia de función de la <i>Th</i> en la expresión de la región posterior del tubo cardíaco.	60
Figura 20. Efecto de la sobreexpresión de la <i>Th</i> en la expresión de <i>Amhc-1</i> y <i>Tbx5</i> en la región anteromedial del tubo cardíaco.	61

Tabla 3.	Efecto de la sobreexpresión de la <i>Th</i> en la frecuencia cardíaca.	62
Figura 21.	Efecto del ácido retinoico en la expresión de la <i>Th</i> , <i>Amhc-1</i> y <i>Tbx5</i> .	63
Figura 22.	Efecto de la inhibición de la síntesis del ácido retinoico.	64
Figura 23.	RT-qPCR para los receptores dopaminérgicos <i>D1</i> , <i>D3</i> y <i>D5</i> en el tubo cardíaco del embrión de pollo de st 10 y st 12.	64
Figura 24.	Expresión de la proinsulina en el desarrollo cardíaco del embrión de pollo.	66
Figura 25.	Expresión de la proinsulina en el desarrollo cardíaco del embrión de pollo (RT-qPCR)	67
Figura 26.	Procesamiento del intrón 1 de la proinsulina tras la electroporación de la construcción conteniendo el cDNA del transcrito <i>Pro1B1</i> .	68
Figura 27.	Hibridación <i>in situ</i> para proinsulina tras la electroporación con la construcción que sobreexpresa el transcrito pancreático (pCAGs-Pro1A-I-GFP) o con la construcción control (pCAGs-I-GFP).	69
Figura 28.	Análisis de la traducción del transcrito de proinsulina <i>Pro1A</i> tras la electroporación.	70
Figura 29.	Análisis del efecto de la sobreexpresión de proinsulina en la región precardiogénica del embrión de pollo.	71
Tabla 4.	Malformaciones observadas en la morfogénesis cardíaca tras la sobreexpresión de los transcritos de proinsulina.	72
Figura 30.	Efecto de la sobreexpresión del transcrito <i>Pro1B</i> de proinsulina.	73
Figura 31.	Expresión génica de la proinsulina en el desarrollo cardíaco del embrión de ratón.	74
Figura 32.	Descripción esquemática de una sección transversal a través de la región del campo cardíaco de st 5.	78
Figura 33.	Esquema del papel de la TH en la regulación de la red génica de la cardiogénesis del embrión de pollo	80
Figura 34.	Efecto de la sobreexpresión del transcrito embrionario de proinsulina (<i>Pro1B</i>) en la expresión génica del tubo cardíaco primitivo.	84

11. ANEXOS.

Tyrosine hydroxylase is expressed during early heart development and is required for cardiac chamber formation

Carmen López-Sánchez^{1†}, Óscar Bártulos^{2†}, Enrique Martínez-Campos², Carlos Gañán¹, Ana I. Valenciano³, Virginio García-Martínez¹, Flora De Pablo^{2,4}, and Catalina Hernández-Sánchez^{2,4*}

¹Human Anatomy and Embryology, Facultad de Medicina, Universidad de Extremadura, E-06080 Badajoz, Spain; ²3D Lab, Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain; ³Department of Animal Physiology II, Facultad de C. Biológicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain; and ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas (CIBERDEM, ISCIII), Barcelona, Spain

Received 1 May 2010; revised 25 May 2010; accepted 27 May 2010; online publish-ahead-of-print 3 June 2010

Time for primary review: 36 days

Aims

Tyrosine hydroxylase (TH) is the first and rate-limiting enzyme in catecholamine biosynthesis. Whereas the neuro-endocrine roles of catecholamines postnatally are well known, the presence and function of TH in organogenesis is unclear. The aim of this study was to define the expression of TH during cardiac development and to unravel the role it may play in heart formation.

Methods and results

We studied TH expression in chick embryos by whole mount *in situ* hybridization and by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction and analysed TH activity by high-performance liquid chromatography. We used gain- and loss-of-function models to characterize the role of TH in early cardiogenesis. We found that TH expression was enriched in the cardiac field of gastrulating chick embryos. By stage 8, TH mRNA was restricted to the splanchnic mesoderm of both endocardial tubes and was subsequently expressed predominantly in the myocardial layer of the atrial segment. Overexpression of TH led to increased atrial myosin heavy chain (AMHC1) and T-box 5 gene (Tbx5) expression in the ventricular region and induced bradyarrhythmia. Similarly, addition of L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) or dopamine induced ectopic expression of cardiac transcription factors (cNkx2.5, Tbx5) and AMHC1 as well as sarcomere formation. Conversely, blockage of dopamine biosynthesis and loss of TH activity decreased AMHC1 and Tbx5 expression, whereas exposure to retinoic acid (RA) induced TH expression in parallel to that of AMHC1 and Tbx5. Concordantly, inhibition of endogenous RA synthesis decreased TH expression as well as that of AMHC1 and Tbx5.

Conclusion

TH is expressed in a dynamic pattern during the primitive heart tube formation. TH induces cardiac differentiation *in vivo* and it is a key regulator of the heart patterning, conferring atrigenic identity.

Keywords

Tyrosine hydroxylase • Cardiogenesis • L-DOPA • Dopamine

1. Introduction

Catecholamines are hormones/neurotransmitters known to influence cardiovascular and endocrine physiology postnatally and processes such as movement, learning, and emotional behaviour. Tyrosine hydroxylase (TH) is the first and rate-limiting enzyme in

catecholamine biosynthesis. TH catalyses the conversion of the amino acid L-tyrosine to L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA), which generates dopamine by the action of aromatic amino acid decarboxylase (AADC). Subsequently, dopamine can be converted to noradrenaline, by the dopamine beta hydroxylase (DBH), and adrenaline in the mature nervous system and adrenal glands (Figure 1A).¹

[†] These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author. Tel/fax: +34 91 534 9201, Email: chernandez@cib.csic.es

Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2010. For permissions please email: journals.permissions@oxfordjournals.org.

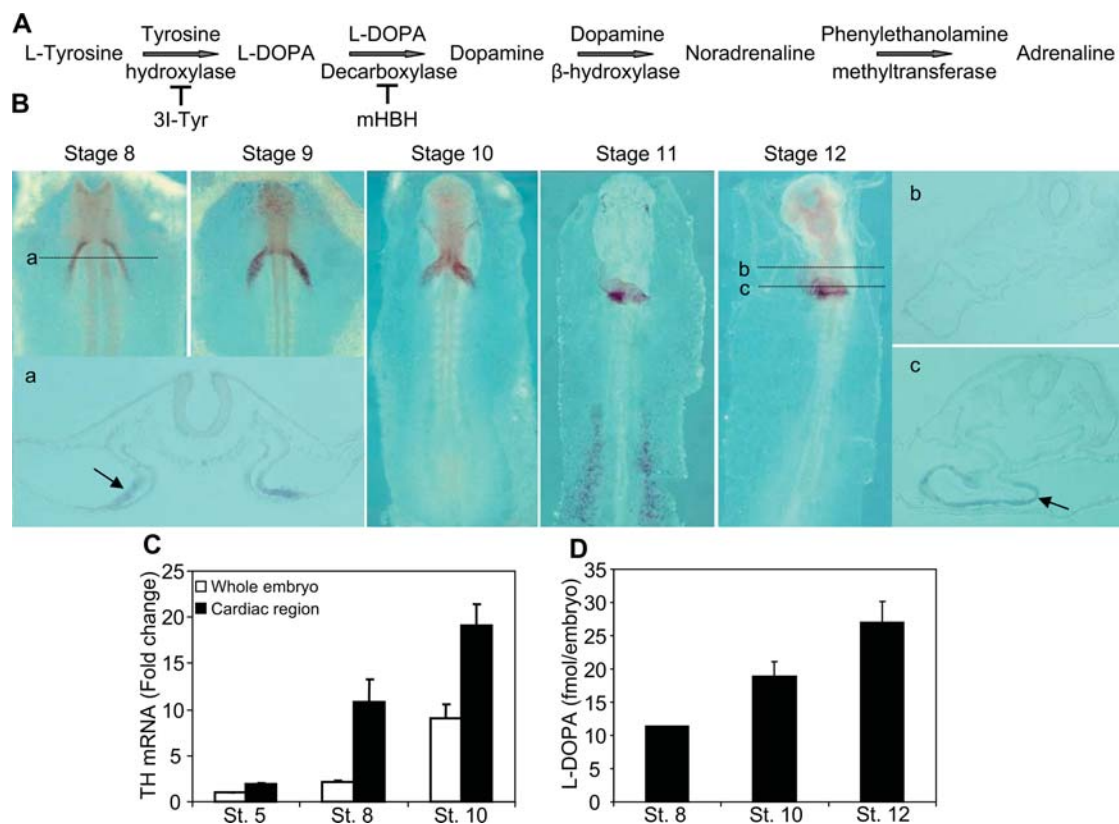


Figure 1 Tyrosine hydroxylase expression and activity in developing chick embryos. (A) The catecholamine biosynthesis pathway. (B) Whole-mount ISH for TH at st. 8–12. a, b, and c correspond to transverse paraffin sections at the levels indicated by the corresponding lines. Note that at st. 8 TH mRNA is restricted to the splanchnic mesoderm of the endocardial tubes, and later it is predominantly expressed in the myocardial layer of the atrio-genic region (arrows in a and c). (C) RT–qPCR of RNA from whole embryos at st. 5, 8, and 10 or from their corresponding cardiac regions. The levels of TH mRNA were normalized to GAPDH mRNA levels. The results represent the mean \pm SD of three experiments. (D) L-DOPA was measured by HPLC in extracts from one pool of 30 st. 8 embryos, two pools of 15 st. 10 embryos and two pools of 10 st. 12 embryos. The results represent, except in st. 8, the mean \pm SD.

Despite the well-characterized biological functions of catecholamines in postnatal organisms, very little is known about their function in embryonic development prior to neuronal differentiation. Early reports of the presence of the pathway members, and their pharmacological and genetic interference, revealed roles in gastrulation and early organogenesis.² Indeed, null-mutations of TH and DBH caused embryonic lethality^{3–5} due to apparent heart failure. Although studies of the TH-null mice revealed a functional role of TH in maintaining oxygen homeostasis at mid-gestation stages,^{6,7} the role of TH in early cardiogenesis remains unexplored.

In vertebrates, the heart is initially formed by the fusion of the two bilateral endocardial tubes arising in the lateral plate splanchnic mesoderm. The resulting primitive heart tube, located at the ventral midline of the organism, undergoes a complex series of movements and tissue remodelling events that leads to the formation of the mature chambered organ.⁸ Positional information for the formation of the atria and ventricles at specific sites within the heart tube, comes from the integration of the anterior–posterior, dorso-ventral, and left–right patterning at early stages.⁹ One of the first features of anterior–posterior patterning is the restriction of the ventricular myosin heavy chain (VMHC1) and atrial myosin heavy chain (AMHC1) to the anterior and posterior pole, respectively, of the heart tube.^{10–12} In this study, we show that TH mRNA is enriched

in the cardiac field of stage (st.) 5 chick embryos; by st. 8, TH expression was restricted to the splanchnic mesoderm of both endocardial tubes. Subsequently, TH localized predominantly to the myocardial layer of the posterior atrial segment heart tube. Treatments with L-DOPA and dopamine induced ectopic expression of cardiac transcription factors and the contractile protein AMHC1, as well as sarcomere formation. Overexpression of TH led to the expansion of AMHC1 and Tbx5 expression into the anterior region, and induced bradyarrhythmia. Inhibition of dopamine biosynthesis or knockdown of TH decreased AMHC1 and Tbx5 expression, and perturbed correct cardiac looping. Exposure to retinoic acid (RA) induced and expanded TH expression, as well as that of AMHC1 and Tbx5, whereas blockage of endogenous RA synthesis inhibited TH expression. Our results show that TH is expressed in a dynamic pattern during the formation of the primitive heart tube. TH induces cardiac differentiation *in vivo* and it is a key regulator of the heart patterning, conferring atrio-genic identity.

2. Methods

Experimental protocols with animals were performed in agreement with the Spanish law in application of the EU Guidelines for animal research, and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory

Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23). Approval by the CIB bioethics board was obtained prior to the initiation of the study. For details on the following methods, see Supplementary materials online.

2.1 Early chick embryo culture and citral treatment

Fertilized eggs (Granja Santa Isabel, Córdoba, Spain) were incubated at 38°C in forced-draft, humidified incubators. Embryos were staged and cultured. For citral treatment, 20 µL of test solution were applied over embryos at st. 5. Embryos were fixed in 4% paraformaldehyde acid (PFA, in phosphate buffer, pH 7.4) at st. 10–11 and processed for whole mount *in situ* hybridization (ISH).

2.2 Embryo electroporation

St. 3 cultured embryos were injected and electroporated in the region determined to form the heart. For gain-of-function experiments the pCAGs-I-GFP (control) or pCAGs-TH-I-GFP vector was electroporated. For knock-down experiments, either fluorescein-labelled luciferase or TH morpholino oligonucleotide (MO) (Gene Tools LLC) was electroporated. After 18–36 h of additional incubation, embryos were either fixed in 4% PFA and processed for whole mount ISH or the atria and ventricles were collected for RNA isolation.

2.3 Bead implantation

Beads were soaked in the indicated solutions and implanted in the desired location at st. 5 (Figure 2A). After 6–18 h of additional incubation, embryos were fixed in 4% PFA and processed for whole mount ISH or immunohistochemistry.

2.4 High-performance liquid chromatography analysis

St. 8 and st. 10 embryos were processed to detect catecholamines by high-performance liquid chromatography (HPLC) with colorimetric detection.

2.5 ISH and immunohistochemistry

Embryos were processed for ISH following standard procedures. The probes for cAMHC1, cVMHC1, Irx4, Bmp2, and cNkx2.5 have been described. The cTH and cTbx5 probes were generated by RT–PCR cloning. Whole mount immunohistochemistry was performed using an anti-myosin heavy-chain monoclonal antibody (MF20) followed by anti-mouse Ig-HRP antibody.

2.6 RNA isolation and RT–qPCR

Total RNA was isolated with the Trizol reagent and reverse transcribed with the Superscript III and random primers (Invitrogen). qPCR was performed with the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) by using TaqMan Universal PCR Master Mix, No-AmpErase UNG (Applied Biosystems) and the probes of the Universal Probe Library (URL, Roche Applied Science) were used for detection. Primer sequences and the respective URL probes are listed in supplementary material.

2.7 Plasmids

The pCAGs-TH-I-GFP was generated by excising the TH cDNA from the pCRII-TOPO-TH, described above, with *EcoRI* and cloning it into the similarly digested pCAGs-I-GFP.

3. Results

3.1 Early TH expression is localized to the developing heart and is active prior to its appearance in the nervous system

In postnatal organisms, TH is predominantly expressed in discrete areas of the brain, in the peripheral nervous system, and in the adrenal gland. However, our identification of a dynamic pattern of TH expression in the early chick (EC) embryo¹³ led us to search for an as yet uncharacterized, preneuronal, function for TH. Whole mount ISH demonstrated that TH mRNA was expressed in st. 8 embryos, in the heart forming regions overlying the left and right endocardial tubes (Figure 1B and see Supplementary material online, Figure S1). Transverse sections showed that TH mRNA was restricted to pre-cardiac splanchnic mesoderm (Figure 1Ba). At st. 9, TH mRNA was found specifically in the fusing cardiac tubes and, once the primitive heart tube was formed, TH displayed a graded pattern of expression. TH transcripts were concentrated in the posterior part of the looping heart, the prospective atrial region (Figure 1B, st. 12). Whereas TH expression was restricted to the myocardial layer at the posterior pole (Figure 1Bc), no transcripts were evident at the anterior pole of the looping heart (the prospective ventricular region: Figure 1Bb). This pattern of gene expression is remarkably similar to that of other genes that become progressively restricted to the posterior heart tube (e.g. AMHC1^{10–12} and Tbx5,^{14–16} see Supplementary material online, Figure S1 for better comparison). Moreover, the distribution of TH transcripts coincided with that of TH protein (data not shown).

The selective cardiac expression of TH was confirmed by RT–qPCR and TH mRNA was detected in gastrulating st. 5 embryos, prior to the time specific staining can be observed by whole mount ISH. TH transcript levels were two-fold higher in the heart field of st. 5 embryos than in the total embryo (Figure 1C) and, overall, TH transcript levels rose as development continued (approximately two-fold between st. 5 and 8 and four-fold between st. 8 and 10). This increase was more noticeable in the cardiac region, particularly between st. 5 and st. 8, in accordance with the distribution observed by ISH.

TH activity depends on allosteric factors and on the phosphorylation state of the enzyme, as well as on the presence of co-factors.^{1,17} To assess whether TH was active at these early embryonic stages, we measured catecholamine levels by HPLC in whole embryos at the endocardial, linear, and looped tube stages (st. 8, 10, and 12, respectively). We chose not to dissect cardiac tissue to avoid material losses. L-DOPA was detected at st. 8 and their levels increased throughout cardiac development (Figure 1D). Dopamine was detected only occasionally at st. 8, 10, and 12, and noradrenaline and adrenaline were not found at these embryonic stages. To explain the absence of catecholamines downstream of dopamine, we analysed the expression of DBH. We could only detect DBH mRNA by RT–qPCR, and no specific signal by ISH was obtained. At all the stages analysed, much lower levels of DBH mRNA than of TH mRNA were found (~9-, 80-, and 190-fold lower at st. 5, 8, and 10, respectively). These differences were even greater (from 12- to 900-fold) in the cardiac region, indicating that the precursor L-DOPA and small amounts of dopamine are the principal, or perhaps the only, catecholamines present in the embryo prior to neuronal differentiation. The facts that dopamine is an unstable metabolite and the HPLC

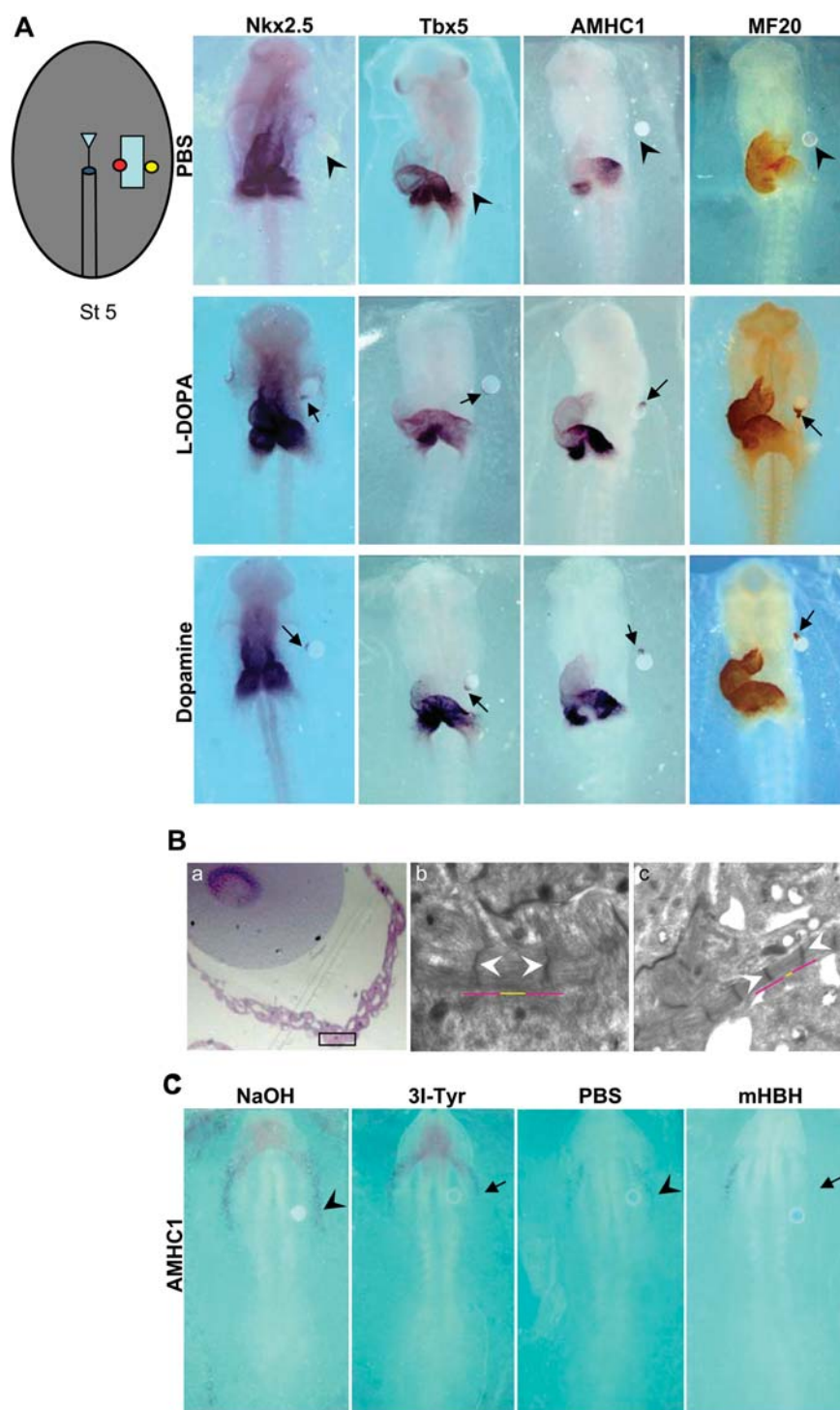


Figure 2 Effect of L-DOPA and dopamine and their inhibition, on cardiac development. (A) Effect of L-DOPA and dopamine on the expression of cardiac genes. Left drawing corresponds to a st. 5 embryo with a bead implanted lateral to one of the bilateral heart fields (yellow bead). Beads were soaked in either PBS (vehicle), or a solution of 10 $\mu\text{mol/L}$ L-DOPA or dopamine. St. 10–12 embryos were subjected to whole-mount ISH for *Nkx2.5*, *Tbx5*, and *AMHC1*, or immunohistochemistry for *MF20*. Ectopic tissue adjacent to the bead coated with L-DOPA or dopamine (arrow) expressed all markers. Labelling was not detected around the control bead (arrowhead). (B) Ultrastructure of the ectopic tissue induced by dopamine. Semi-thin sections of the bead area and ectopic tissue (a: 40 \times). Transmission electron microscopy of cells adjacent to the dopamine bead (b: 20 000 \times) or of cardiomyocytes in the primitive heart tube (c: 10 000 \times). The white arrowheads indicate the Z bands, and the purple and yellow lines delineate the I and A bands, respectively. (C) Effect of the inhibition of L-DOPA or dopamine synthesis on *AMHC1* expression. The position of the bead implanted medial to one of the bilateral heart fields of a st. 5 embryo is shown in (A) (red bead). Beads were soaked in either 3I-Tyr or mHBH, or the vehicle solution (NaOH and PBS, respectively). Embryos at st. 8 were analysed by whole-mount ISH for *AMHC1*. Note that *AMHC1* expression is inhibited in the endocardial tube ipsilateral to the bead (arrow), but not by the control bead (arrowhead).

method is less sensitive for dopamine than for L-DOPA detection may account for the irregular detection of the former. These results extend previous findings, using less sensitive assays, where TH activity in the chick embryo was detected on the first day of incubation (st. 8), yet DBH activity was not evident until st. 19–20.¹⁸

3.2 L-DOPA and dopamine induce cardiac differentiation

The pattern of TH expression and the presence of catecholamines suggested that TH, L-DOPA, and possibly dopamine may play a role in cardiac development. We thus implanted heparine-acrylamide beads soaked in either L-DOPA (10 µmol/L) or dopamine (10 µmol/L) lateral to one of the bilateral heart fields in embryos cultured at st. 5 (Figure 2A, yellow bead). These embryos were allowed to develop until the linear or looped heart stage (st. 10 and 12, respectively), and were subsequently analysed by whole mount ISH. St. 12 was the furthest developmental stage analysed because the EC culture interferes with normal development beyond this stage. L-DOPA and dopamine induced expression of the cardiac transcription factors Nkx2.5 and Tbx5 in the ectopic tissue adjacent to the bead (Figure 2A; see Supplementary material online, Table S1). Moreover, expression of AMHC1, a sarcomeric protein and marker of terminal cardiac differentiation,^{10,12} was also induced, as seen by ISH and by immunohistochemistry with the MF20 antibody. The cells of the induced ectopic tissue adjacent to the bead developed myofibrils organized into sarcomeres, similar to those found in the cardiomyocytes of the primitive heart tube (Figure 2B). No ectopic tissue or ectopic expression of cardiac genes was provoked by control beads (Figure 2A), ruling out the possibility that implantation of the bead alone triggered ectopic cardiogenesis. This also argues against the possibility that the bead acts as a physical barrier for an inhibitory signal, and suggests that exogenous L-DOPA and dopamine can stimulate cardiomyocyte differentiation. Preliminary studies show that dopamine beads also induce the expression of Bmp2 (see Supplementary material online, Figure S2), linking TH to early cardiac differentiation programmes.¹⁹

We further confirmed this hypothesis by blocking the endogenous synthesis of L-DOPA and dopamine. Accordingly, beads soaked in either 3-iodo-tyrosine (3I-Tyr, 1 mmol/L), an inhibitor of TH, or in meta-hydroxybenzylhydrazine (mHBH, 1 mmol/L), an inhibitor of L-DOPA decarboxylase (Figure 1A), were implanted medial to one of the bilateral heart fields of cultured embryos at st. 5 (Figure 2A, red bead). Blockage of L-DOPA, and more clearly of dopamine biosynthesis, led to an ipsilateral decrease of AMHC1 expression in the endocardial tube at st. 8 (Figure 2C; see Supplementary material online, Table S2). These results suggest that dopamine synthesis is necessary for the correct expression of AMHC1.

3.3 Overexpression and knock-down of TH modified the limits of the cardiac chambers

To gain further insight into the role of TH in cardiac differentiation, we performed gain-of-function experiments. A bicistronic construct containing the chicken TH cDNA and the GFP cDNA (pCAGs-TH-I-GFP) was injected and electroporated into the cardiac progenitor cells that were migrating through the primitive streak of st. 3 embryos. As a control, we used a vector containing the GFP cDNA alone (pCAGs-I-GFP). Analysis of TH expression in pCAGs-TH-I-GFP electroporated embryos confirmed that TH

mRNA and protein coincided with GFP expression (see Supplementary material online, Figure S3). In addition, there was an increase in L-DOPA levels measured by HPLC in embryos overexpressing TH (data not shown). Consistent with the myocardiogenic stimulatory effect of the L-DOPA and dopamine beads (Figure 2A), the embryos overexpressing TH displayed a marked increase in AMHC1 expression when compared with control electroporated or non-electroporated embryos, particularly at the stages of heart tube fusion and looping (st. 10 and 12, respectively; Figure 3A). In addition, the domain of AMHC1 expression at the looped heart tube stage (st. 12) had expanded abnormally towards the anterior pole of the primitive heart tube (Figure 3A). To further characterize the changes in the developing heart, we analysed the expression of Tbx5. This T-box family transcription factor is expressed in cardiac progenitors and, as development proceeds, it is found in a graded fashion along the heart tube with the highest levels in the sino-atrial region.^{14–16} Significantly, the pattern of Tbx5 expression in these tissues very closely resembles that of TH and AMHC1 (see Supplementary material online, Figure S1). Like AMHC1 expression, Tbx5 expression expanded abnormally towards the anterior region of the heart tube in TH-overexpressing embryos (Figure 3A, see Supplementary material online, Table S3). Moreover, RT-qPCR analysis of dissected ventricles showed a six-fold increased of AMHC1 levels in TH overexpressing embryos when compared with control electroporated ventricles (Figure 3B). Tbx5 expression increased more modestly (not statistically significant) similarly to what was also observed by ISH.

We then analysed the effect of TH on the expression of the ventricular myosin heavy chain, VMHC1, initially expressed throughout the entire heart tube and down-regulated in the atria after the looping stage (st. 12–13).^{11,12,20} VMHC1 became restricted to the anterior region of the heart tube of TH-overexpressing embryos (Figure 3C, see Supplementary material online, Table S4). Likewise, the expression of the transcription factor Irx4, which is involved in specifying the prospective ventricular region,²⁰ regressed anteriorly (Figure 3C), suggesting that TH confers a posterior character on the looping heart tube.

Overexpression of TH also had major functional consequences, since TH-electroporated embryos displayed characteristics compatible with bradyarrhythmia (see Supplementary material online, movie online). When recorded in culture, the heart rate of control electroporated embryos at st. 11 was 100 beats per minute (bpm), compared with 53 bpm in TH-overexpressing embryos (Table 1). In addition, TH-electroporated embryos displayed arrhythmic heart beats (see Supplementary material online, movie online).

To further confirm that TH is a fundamental element in cardiac development, we knocked down TH expression. A TH MO or luciferase, control MO were electroporated into the cardiac progenitor cells migrating through the primitive streak of st. 3 chick embryos. The TH morphants displayed a decrease in the expression of the atrial markers AMHC1 and Tbx5 (Figure 4A). Conversely, the expression of VMHC1 in the most affected embryos was increased (Figure 4A). In parallel, the silencing of TH expression diminished the atrial segment area and oversized the ventricular segment (Figure 4B, see Supplementary material online, Table S5). Similar anterior–posterior heart patterning disruption was observed when RA signalling was inhibited.²¹ Additionally, the progress of cardiac morphogenesis was very limited: TH morphants displayed a globular cardiac tube that did not form a fully looped tube (Figure 4B), and the dysmorphic hearts barely beat (data not shown).

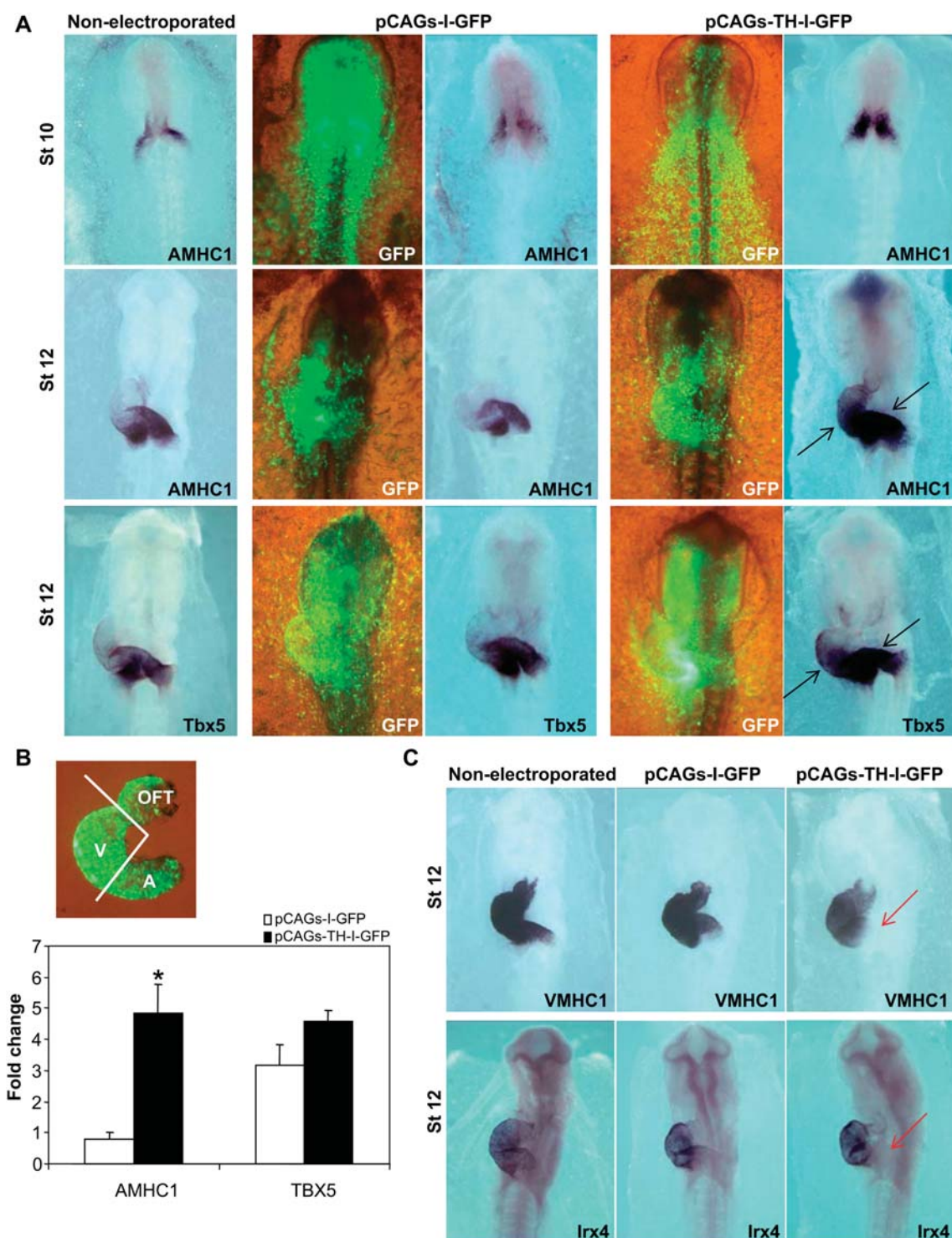


Figure 3 Effect of TH on anterior–posterior heart tube patterning and specification of chambers. (A) Effect of TH gain-of-function on sino-atrial gene expression. Whole-mount ISH for AMHC1 and Tbx5 in non-electroporated embryos, and in embryos electroporated with either the control construct (pCAGs-I-GFP) or with the TH expressing construct (pCAGs-TH-I-GFP). The anterior expanded expression of AMHC1 and Tbx5 in the heart tube is indicated by the black arrows. Visualization of GFP expression for the embryos processed for ISH is shown in the corresponding left panels. (B) RT–qPCR of RNA from ventricles (V in scheme) of st. 12 embryos electroporated with either the control construct (pCAGs-I-GFP) or with the TH expressing construct (pCAGs-TH-I-GFP). The levels of AMHC1 and Tbx5 mRNA were normalized to GAPDH mRNA levels. The results represent the mean \pm SEM of three pools of four ventricles each. * $P < 0.01$ with respect to pCAGs-I-GFP electroporated embryos. (C) Effect of TH gain-of-function on ventricular gene expression. Whole-mount ISH for VMHC1 and Irx4 in embryos as in (A). The posterior regression of VMHC and Irx4 expression is indicated by the red arrows. In supplementary materials this figure is reproduced including GFP expression (see Supplementary material online, Figure S4).

Table I Effect of TH overexpression on heart rate			
	Non-electroporated (n = 10)	pCAGs-I-GFP (n = 10)	pCAGs-TH-I-GFP (n = 10)
BPM	100.6 ± 3.53	100.5 ± 3.02	53.1 ± 2.68

BMP, Beats per minute.
The results represent the mean ± SD.

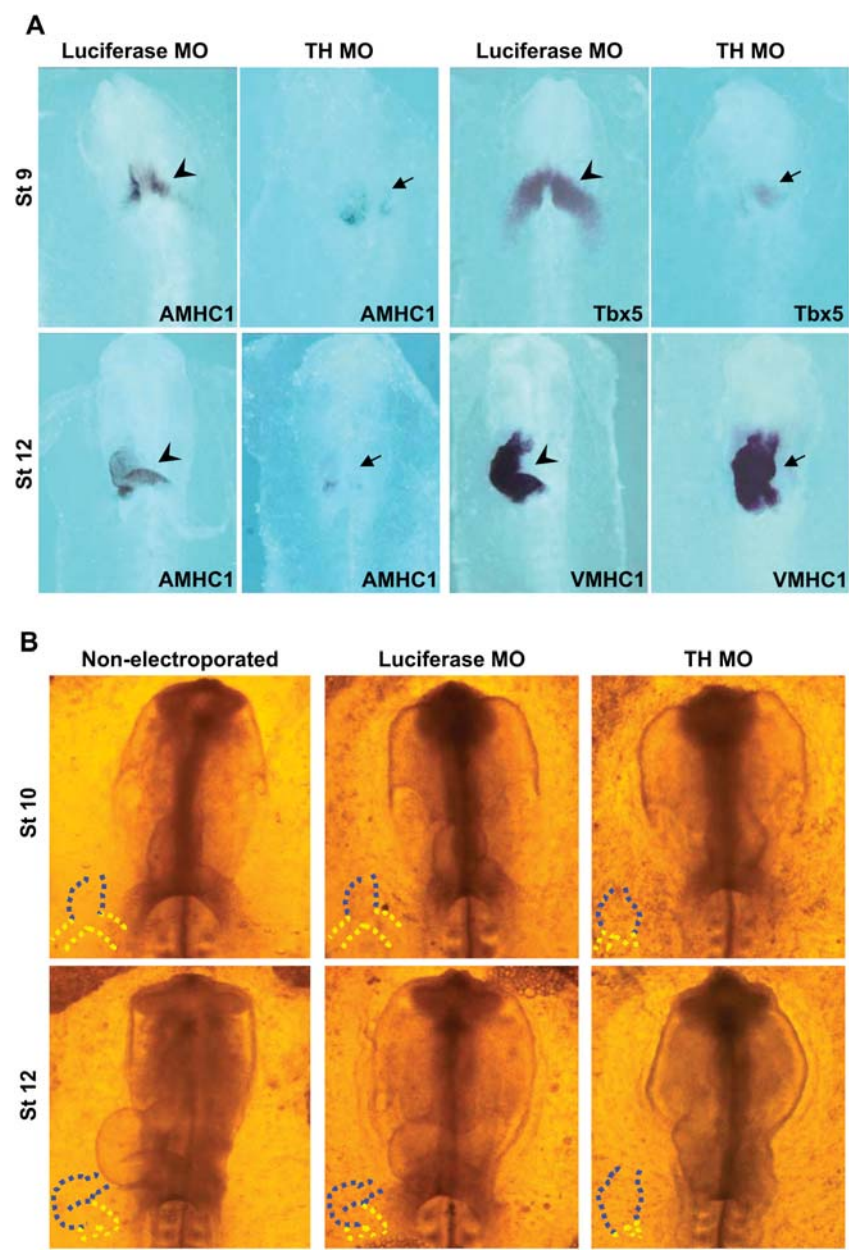


Figure 4 Effect of TH knock-down on anterior–posterior heart tube patterning and specification of chambers. (A) Whole-mount ISH for AMHC1, Tbx5, and VMHC1 in embryos electroporated with either luciferase MO or with TH MO. Note also the decrease in AMHC1 and Tbx5 expression in the TH MO treated (arrow) versus the luciferase MO control (arrowhead). On the contrary, VMHC1 expression did not change or showed a mild increase. (B) Light microscopy of st. 10 and 12 non-electroporated or electroporated embryos with either luciferase MO or with TH MO. The heart tube of the TH morphants show abnormal morphogenesis displaying an atrophic sino-atrial region and oversized ventricular region (in embryos with comparable number of somites and similar prosencephalon development). The ventricular segment is outlined in blue and the sino-atrial segment in yellow.

3.4 TH action is linked to RA patterning effect

To integrate these findings into what is already known about heart morphogenesis; we turned to the effect of RA known to be involved in cardiac patterning. In vertebrates, the anterior–posterior identity of the primitive heart tube is established by RA signalling.²² The documented posteriorization of RA^{12,16,21,23,24} and that of TH described here, together with the fact that TH gene expression and activity are positively regulated by RA in the nervous system and adrenal gland,^{25,26} suggested that TH might be a putative downstream target of RA activity in establishing the anterior–posterior heart tube axis.

We tested this hypothesis by implanting beads soaked in RA (10 µg/mL) into the heart field of cultured embryos at st. 5. RA expanded the expression of TH mainly in the ipsilateral inflow tract, as well as rostrally within the heart tube. A parallel effect was observed on the expression of AMHC1 and Tbx5 (Figure 5A, see Supplementary material online, Table S6). To further support that TH expression is under RA control, we inhibited endogenous RA synthesis with citral. Accordingly, cultured embryos treated at st. 5 with citral (10 mmol/L) displayed a dramatic decrease in TH expression parallel to diminished AMHC1 and Tbx5 expression (Figure 5B, see Supplementary material online, Table S7).

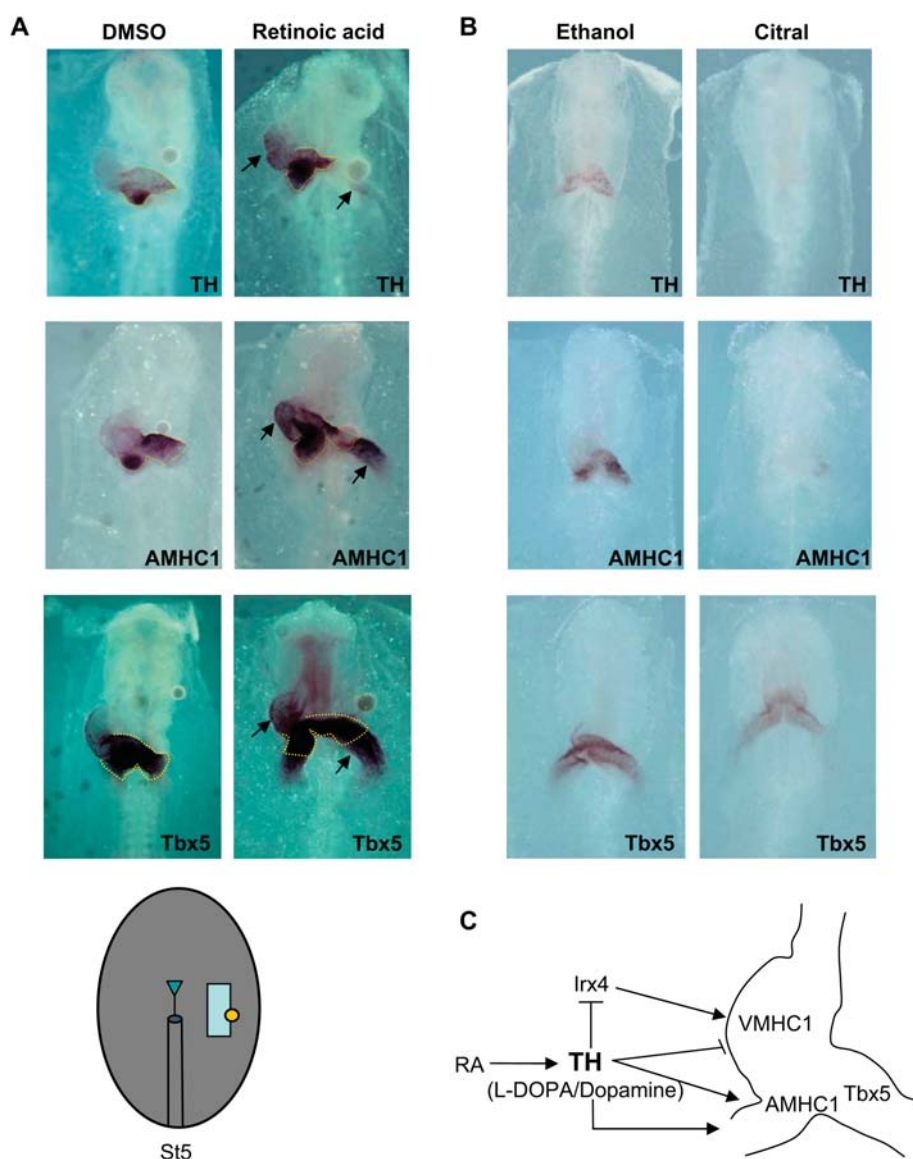


Figure 5 TH, AMHC1, and Tbx5 expression are controlled by RA. (A) Increased TH, AMHC1, and Tbx5 expression by RA. St. 5 embryos with a bead soaked in either DMSO (vehicle) or RA implanted lateral to one of the bilateral heart fields (yellow bead) were then analysed by whole-mount ISH at st. 12. The expanded expression of TH, AMHC1, and Tbx5 in the heart tube and in the inflow tract are indicated by arrows, and their normal expression domains are outlined by yellow dotted-lines. (B) Decreased TH, AMHC1, and Tbx5 expression by RA synthesis inhibition. St. 5 embryos were treated with ethanol (vehicle) or 10 mmol/L citral and analysed by ISH at st. 10–11. (C) Scheme of the interplay of RA and TH in chamber-specific genes regulation.

4. Discussion

The results presented here indicate that TH/L-DOPA/dopamine are involved in the network of signals that drive cardiac precursor cells to a sino-atrial fate, specifically by regionalizing *Tbx5* and *AMHC1* expression to the posterior part of the heart tube.

In st. 5 chick embryos, TH mRNA was enriched in the cardiac field; by st. 8, TH expression localized to the splanchnic mesoderm of endocardial tubes and it progressively became restricted to the sino-atrial region. Perturbing graded TH expression altered atrial and ventricular myosin segregation. Thus, whereas an increase in TH levels resulted in expansion of the *AMHC1* and *Tbx5* atrial domains and regression of the *VMHC1* and *Ir4* ventricular domains, loss of TH activity decreased *AMHC1* and *Tbx5* expression, and occasionally increased *VMHC1* expression. The less widespread *VMHC1* expansion phenotype indicates that other factors are probably involved in restricting *VMHC1* expression. Significantly, it has been shown that the graded expression of *Tbx5* is crucial for the correct cranio-caudal patterning of the primitive heart tube, since disruption of this pattern results in abnormalities in heart chamber formation.^{14–16} Indeed, the Holt–Oram syndrome in humans (with structural cardiac and conduction anomalies) is associated with mutations in the *TBX5* gene.^{27–29}

The graded expression of *Tbx5* and the posterior identity of the primitive heart tube are maintained by RA. An excess of RA causes expansion towards the anterior region of genes that are normally concentrated to the posterior region (i.e. *Tbx5* and *AMHC1*), together with hyperplasia of the sino-atrial region.^{12,16,21,24} Conversely, inhibition of RA signalling impairs development of the sino-atrial region and enlarges that of the ventricular region.^{21,23} In our model system, we uncover a link between RA and TH action as suggested by the parallelism in the effect of blockage of endogenous TH expression and inhibition of RA signalling,²¹ together with the fact that RA controlled TH expression. Thus, according to these results, TH appears to reinforce the genetic program of the sino-atrial region, in a scenario where RA modulates the graded TH expression in the heart tube. In concert, TH activity favours the restriction of *Tbx5* and *AMHC1* expression to the posterior heart tube, whereas suppressing *Ir4* and *VMHC1* in the prospective atria (Figure 5C).

Alteration of TH expression (gain or loss) had also important functional consequences. Increased TH expression led to low rate and arrhythmic heart beating whereas loss of TH activity caused partial looping and discontinuous beating of the heart tube. The cause of this abnormal functionality is an open question. Previous studies have shown that restricting expression of contractile proteins to the ventricular and atrial chamber, including that of the myosin heavy and light chains, is essential for normal cardiac function.^{30–32} Given that TH overexpression alters the distribution of atrial and ventricular myosin heavy-chain isoforms, this could be at least partially responsible for some of the heart function abnormalities found in the TH-overexpressing embryos. Nevertheless, we are tempted to speculate that TH might be involved in specifying the cardiac pacemaker of the embryonic heart. In the chick, the pacemaker differentiates at around st. 9–10 in the posterior most segment of the primitive heart tube,³³ assuring the rhythmic propagation of the action potential with posterior–anterior polarity. The bradyarrhythmia of the TH-overexpressing embryos, together with the restriction of TH expression to the sino-atrial region, are compatible with the interpretation that the gradient of TH activity in the primitive heart tube may

be part of the signals leading to the dominance of the pacemaker in the posterior tube. This phenomenon could also be responsible for the development of the prospective sino-atrial node responsible for the pacemaker activity in the adult heart. This hypothesis is consistent with Pollack's proposal several decades ago³⁴ (reviewed by Ebert³⁵) that catecholamines are essential for cardiac pacemaker specification. Future experiments analysing the expression of early pacemaker genes, among others, should clarify the role of TH in the pacemaker specification.

Generation of the catecholamine depleted mice models (TH and DBH knockouts)^{3–5} have more recently shown that catecholamines are essential for embryo survival beyond mid-gestation. The catecholamine deficient mice die from apparent heart failure starting at E11.5–12.5, and the heart of surviving embryos is able to beat autonomously with slight bradycardia. Albeit the penetrance of the lethal phenotype was variable and some null-mice survived to term, recent reports have shown that catecholamines, in particular noradrenaline, mediate foetal survival by maintaining oxygen homeostasis in mid-gestation.^{6,7} Moreover, restoration of noradrenaline, although not of dopamine, synthesis in the noradrenergic cells is sufficient to prevent lethality.³⁶ Using the chick embryo as a maternally independent vertebrate model, we show that catecholamines, in particular dopamine, also have an earlier role in cardiac morphogenesis. Similar to our results in the chick embryo, in the study by Thomas *et al.*⁴ dopamine was the only catecholamine detected in E9.5 mouse embryos (long before the lethality occurred). In fact, we could detect TH expression in the whole mouse embryo since gastrulation stage at E6.5 and in the heart since E8.5 (the earliest stages analysed) (see Supplementary material online, Figure S3). Our results are compatible with the findings in mice: dopamine plays an important role in early cardiac tube formation, whereas noradrenaline can be essential for mid-gestation foetal survival. Moreover, the apparent absence of major histological alterations in the catecholamine null-mice could be due to the presence of compensatory factors, including a potential contribution of maternal catecholamines⁴ or to species variation. A detailed characterization of the phenotype in mouse organogenesis would be required to unravel the role of all catecholamines in mouse cardiogenesis.

Here, we have shown a strong concordant phenotype in TH-gain and loss-of-function experiments in chick embryos. The remarkable change in the pattern of electrical activation in the TH-overexpressing hearts is also consistent with the identification of intrinsic catecholamine-synthesizing cardiac cells, in human and rodent hearts, prior to innervation.^{37,38} In mice and rats, cardiac catecholaminergic cells appear to be associated with the pacemaker and conduction system in four-chamber hearts.³⁷

The three-dimensional requirements of cardiac development need complex signalling networks to lead cells through the appropriate fate decisions and morphogenetic movements.^{8,39} In addition, antero-posterior polarity plays a role in the coupling between heart and blood vessels. Here, we reveal a novel function of TH in cardiac development, and suggest that TH may be a key player acting in concert with additional factors to define multiple aspects of chamber identity, including pacemaker specification. These results are consistent with the paradigm whereby molecules that act as intercellular signalling mediators, with well-defined restricted roles in postnatal organisms, are present at embryonic stages, when they participate in diverse functions often unrelated to their later roles (reviewed in^{40,41}). The relevance of TH in human cardiogenesis and the possible significance

of TH pathway alterations in cardiac syndromes may be a field deserving further studies.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

Acknowledgements

We thank C. Murillo for her invaluable technical help. We are grateful to C. Cepko (Harvard Medical School, USA) for providing the *Irx4* probe, C. Pujades (Pompeu Fabra University, Spain) for providing the pCAGs-I-GFP vector. We thank A. Aránega and D. Franco (Jaén University, Spain), R. Kelly (CNRS-Université de la Méditerranée, France), and T. Suárez and E.J. de la Rosa (Lab 3D, CIB) for comments on the typescript.

Conflict of interest: None declared.

Funding

This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation (MICINN) [BFU2007-61055 to C.H.-S., BFU2007-66350/BFI to C.L.-S.]; and the Junta de Extremadura [PRI07A005 to V.G.-M.].

References

- Fitzpatrick PF. Tetrahydropterin-dependent amino acid hydroxylases. *Annu Rev Biochem* 1999;**68**:355–381.
- Pendleton RG, Rasheed A, Roychowdhury R, Hillman R. A new role for catecholamines: ontogenesis. *Trends Pharmacol Sci* 1998;**19**:248–251.
- Kobayashi K, Morita S, Sawada H, Mizuguchi T, Yamada K, Nagatsu I et al. Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase locus results in severe catecholamine depletion and perinatal lethality in mice. *J Biol Chem* 1995;**270**:27235–27243.
- Thomas SA, Matsumoto AM, Palmiter RD. Noradrenaline is essential for mouse fetal development. *Nature* 1995;**374**:643–646.
- Zhou QY, Quaife CJ, Palmiter RD. Targeted disruption of the tyrosine hydroxylase gene reveals that catecholamines are required for mouse fetal development. *Nature* 1995;**374**:640–643.
- Portbury AL, Chandra R, Groelle M, McMillan MK, Elias A, Herlong JR et al. Catecholamines act via a beta-adrenergic receptor to maintain fetal heart rate and survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;**284**:H2069–2077.
- Ream MA, Chandra R, Peavey M, Ray AM, Roffler-Tarlov S, Kim HG et al. High oxygen prevents fetal lethality due to lack of catecholamines. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;**295**:R942–953.
- Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet* 2005;**6**:826–835.
- Moorman AF, Christoffels VM. Cardiac chamber formation: development, genes, and evolution. *Physiol Rev* 2003;**83**:1223–1267.
- Oana S, Machida S, Hiratsuka E, Furutani Y, Momma K, Takao A et al. The complete sequence and expression patterns of the atrial myosin heavy chain in the developing chick. *Biol Cell* 1998;**90**:605–613.
- Somi S, Klein AT, Houweling AC, Ruijter JM, Buffing AA, Moorman AF et al. Atrial and ventricular myosin heavy-chain expression in the developing chicken heart: strengths and limitations of non-radioactive in situ hybridization. *J Histochem Cytochem* 2006;**54**:649–664.
- Yutzy KE, Rhee JT, Bader D. Expression of the atrial-specific myosin heavy chain AMHC1 and the establishment of anteroposterior polarity in the developing chicken heart. *Development* 1994;**120**:871–883.
- Hernandez-Sanchez C, Bartulos O, Valenciano AI, Mansilla A, de Pablo F. The regulated expression of chimeric tyrosine hydroxylase-insulin transcripts during early development. *Nucleic Acids Res* 2006;**34**:3455–3464.
- Bruneau BG, Logan M, Davis N, Levi T, Tabin CJ, Seidman JG et al. Chamber-specific cardiac expression of *Tbx5* and heart defects in Holt–Oram syndrome. *Dev Biol* 1999;**211**:100–108.
- Christoffels VM, Habets PE, Franco D, Campione M, de Jong F, Lamers WH et al. Chamber formation and morphogenesis in the developing mammalian heart. *Dev Biol* 2000;**223**:266–278.
- Liberatore CM, Searcy-Schrick RD, Yutzy KE. Ventricular expression of *tbx5* inhibits normal atrial chamber development. *Dev Biol* 2000;**223**:169–180.
- Dunkley PR, Bobrovskaya L, Graham ME, von Nagy-Felsobuki EI, Dickson PW. Tyrosine hydroxylase phosphorylation: regulation and consequences. *J Neurochem* 2004;**91**:1025–1043.
- Ignarro LJ, Shideman FE. Appearance and concentrations of catecholamines and their biosynthesis in the embryonic and developing chick. *J Pharmacol Exp Ther* 1968;**159**:38–48.
- Zaffran S, Frasch M. Early signals in cardiac development. *Circ Res* 2002;**91**:457–469.
- Bao ZZ, Bruneau BG, Seidman JG, Seidman CE, Cepko CL. Regulation of chamber-specific gene expression in the developing heart by *Irx4*. *Science* 1999;**283**:1161–1164.
- Hochgreb T, Linhares VL, Menezes DC, Sampaio AC, Yan CY, Cardoso WV et al. A caudorostral wave of RALDH2 conveys anteroposterior information to the cardiac field. *Development* 2003;**130**:5363–5374.
- Xavier-Neto J, Rosenthal N, Silva FA, Matos TG, Hochgreb T, Linhares VL. Retinoid signaling and cardiac anteroposterior segmentation. *Genesis* 2001;**31**:97–104.
- Niederreither K, Vermot J, Messaddeq N, Schuhbaur B, Chambon P, Dolle P. Embryonic retinoic acid synthesis is essential for heart morphogenesis in the mouse. *Development* 2001;**128**:1019–1031.
- Xavier-Neto J, Neville CM, Shapiro MD, Houghton L, Wang GF, Nikovits W Jr et al. A retinoic acid-inducible transgenic marker of sino-atrial development in the mouse heart. *Development* 1999;**126**:2677–2687.
- Gelain DP, Moreira JC, Bevilacqua LR, Dickson PW, Dunkley PR. Retinol activates tyrosine hydroxylase acutely by increasing the phosphorylation of serine40 and then serine31 in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 2007;**103**:2369–2379.
- Jeong H, Kim MS, Kim SW, Kim KS, Seol W. Regulation of tyrosine hydroxylase gene expression by retinoic acid receptor. *J Neurochem* 2006;**98**:386–394.
- Basson CT, Bachinsky DR, Lin RC, Levi T, Elkins JA, Soultis J et al. Mutations in human *TBX5* [corrected] cause limb and cardiac malformation in Holt–Oram syndrome. *Nat Genet* 1997;**15**:30–35.
- Bruneau BG, Nemer G, Schmitt JP, Charron F, Robitaille L, Caron S et al. A murine model of Holt–Oram syndrome defines roles of the T-box transcription factor *Tbx5* in cardiogenesis and disease. *Cell* 2001;**106**:709–721.
- Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH et al. Holt–Oram syndrome is caused by mutations in *TBX5*, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet* 1997;**15**:21–29.
- Buck SH, Konyn PJ, Palermo J, Robbins J, Moss RL. Altered kinetics of contraction of mouse atrial myocytes expressing ventricular myosin regulatory light chain. *Am J Physiol* 1999;**276**:H1167–H1171.
- Chen J, Kubalak SW, Minamisawa S, Price RL, Becker KD, Hickey R et al. Selective requirement of myosin light chain 2v in embryonic heart function. *J Biol Chem* 1998;**273**:1252–1256.
- Pawloski-Dahm CM, Song G, Kirkpatrick DL, Palermo J, Gulick J, Dorn GW 2nd et al. Effects of total replacement of atrial myosin light chain-2 with the ventricular isoform in atrial myocytes of transgenic mice. *Circulation* 1998;**97**:1508–1513.
- Kamino K, Hirota A, Fujii S. Localization of pacemaker activity in early embryonic heart monitored using voltage-sensitive dye. *Nature* 1981;**290**:595–597.
- Pollack GH. Cardiac pacemaking: an obligatory role of catecholamines? *Science* 1977;**196**:731–738.
- Ebert SN, Taylor DG. Catecholamines and development of cardiac pacemaking: an intrinsically intimate relationship. *Cardiovasc Res* 2006;**72**:364–374.
- Zhou QY, Palmiter RD. Dopamine-deficient mice are severely hypoactive, adipic, and aphagic. *Cell* 1995;**83**:1197–1209.
- Ebert SN, Thompson RP. Embryonic epinephrine synthesis in the rat heart before innervation: association with pacemaking and conduction tissue development. *Circ Res* 2001;**88**:117–124.
- Huang MH, Friend DS, Sunday ME, Singh K, Haley K, Austen KF et al. An intrinsic adrenergic system in mammalian heart. *J Clin Invest* 1996;**98**:1298–1303.
- Srivastava D. Making or breaking the heart: from lineage determination to morphogenesis. *Cell* 2006;**126**:1037–1048.
- Hernandez-Sanchez C, Mansilla A, de la Rosa EJ, de Pablo F. Proinsulin in development: New roles for an ancient prohormone. *Diabetologia* 2006;**49**:1142–1150.
- Sanders EJ, Harvey S. Peptide hormones as developmental growth and differentiation factors. *Dev Dyn* 2008;**237**:1537–1552.